

TÓPICOS DE ACTUALIZACIÓN EN NEUROBIOLOGÍA

**Excitotoxicidad y Cognición en Enfermedades
Neurodegenerativas: Aspectos Básicos,
Clínicos y Sociales**



XXX ANIVERSARIO
LIC. EN BIOLOGÍA, U. DE G.



ciberMed



Academia
Mexicana de
Neurología, A.C.



TÓPICOS DE ACTUALIZACIÓN EN NEUROBIOLOGÍA III

Excitotoxicidad y Cognición en Enfermedades Neurodegenerativas: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales - Memorias Electrónicas

Presentación

Hace aproximadamente tres décadas, en el occidente de la República Mexicana, se dio inicio al desarrollo de la investigación científica en el área de las neurociencias. En los últimos años, se ha experimentado un importante crecimiento tanto en el conocimiento de la disciplina, como en la consolidación de grupos de investigación en el área, coadyuvando de manera importante a la formación de recursos humanos altamente especializados. Así, este desarrollo se refleja en el número creciente de cuerpos académicos (CA) dedicados a las neurociencias reconocidos a través del Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) de la Secretaría de Educación Pública (SEP), así como en la pertenencia y participación de los miembros de dichos CA a la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, la *Society for Neuroscience* y el Sistema Nacional de Investigaciones (SNI). Por lo que en la actualidad, dentro del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, se cuenta con tres CA consolidados, cuyos miembros fungen como profesores investigadores que participan activamente en dos posgrados con reconocimiento en el Padrón Nacional de Posgrados (PNP) del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), el Doctorado en Ciencias Biomédicas (Orientación en Neurociencias) y el Doctorado en Ciencias del Comportamiento, ambos en la Universidad de Guadalajara. Esta condición nos obliga a identificar la necesidad de contar con tópicos actualizados que impulsen aún más el fortalecimiento de estos grupos de investigación, al tiempo que se continúa con la formación de recursos humanos especializados, se promueve la formación de redes de cooperación nacionales e internacionales, se optimizan recursos financieros y se divulga el conocimiento en el área, lo que favorece su aplicabilidad a los problemas reales relacionados con diferentes neuropatologías. De esta manera y con el apoyo decidido de instituciones como la Universidad de Guadalajara, la Universidad de Barcelona, el Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el Desarrollo (CYTED) que permitió la formación de la primera RED temática denominada Grupo de Estudio para las Neurociencias Iberoamericano en Red (GENIAR; RED TEMÁTICA 610RT0405); y dentro del marco de colaboración de estas instituciones con la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), es posible la realización y organización del Curso Internacional TÓPICOS DE ACTUALIZACIÓN EN NEUROBIOLOGÍA en su III edición, denominado

"Excitotoxicidad y Cognición en Enfermedades Neurodegenerativas: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales", a partir del cual se ha generado este volumen de 32 capítulos.

La intención primordial de esta obra radica en aportar una pequeña, pero significativa contribución, que permita actualizar y elevar la calidad en la formación académica de estudiantes de licenciatura, posgrado y profesionales interesados en diversos tópicos de la biología de los procesos neurodegenerativos, relacionados fundamentalmente con condiciones neuropatológicas como la epilepsia y el accidente cerebral vascular, así como con algunas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer y el Huntington, entre otras. En esta obra, también se incluyen algunas de las implicaciones sociales y económicas resultado de la incidencia y prevalencia de estos procesos. Lo anterior sólo ha sido posible a través de la cooperación desinteresada de grupos multidisciplinarios de especialistas, pertenecientes a siete países de Iberoamérica y miembros del GENIAR, a quienes extendemos nuestro reconocimiento y agradecimiento profundo. Así, pues esperamos que esta obra cumpla con las expectativas del lector.

Los Editores, agosto 2010

© 2010, Carlos Beas-Zárate, Mónica Elisa Ureña-Guerrero, Martha C. Rivera-Cervantes, Mercè Pallàs-Lliberia y Antoni Camins , Editores

© 2010 Universidad de Guadalajara, Mexico

La presente obra tiene asociada la siguiente licencia de Creative Commons:
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada



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

1

MECANISMOS DE INDUCCIÓN DEL DAÑO NEURONAL EXCITOTÓXICO Y SU RELACIÓN CON ALGUNAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

¹Ureña-Guerrero ME, ¹Rivera-Cervantes MC, ²Camins A, ¹Beas-Zárate C.

¹Instituto de Neurobiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

²Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB) Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Universitat de Barcelona. Barcelona, España.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el desarrollo de las sociedades humanas, les ha permitido elevar significativamente su esperanza de vida, llegando a ser mayor de 80 años, en los países más desarrollados. Sin embargo, también se ha elevado la incidencia de padecimientos crónico-degenerativos, condición que implica un elevado gasto para los sistemas de salud, debido a la necesidad de tratamientos farmacológicos y asistencia sanitaria por tiempo prolongado. Este tipo de padecimientos, se presentan en principio cuando tipos celulares específicos disminuyen su eficacia funcional, lo que en la mayoría de los casos, culmina con la muerte de dichas células. Las enfermedades neurodegenerativas, no son la excepción y todas ellas cursan por una pérdida neuronal sustancial, que puede ser ocasionada por una alteración genética, por un daño severo y agudo, o como parte de un proceso crónico, asociado a otros padecimientos o al envejecimiento. De esta manera, muchos de los esfuerzos en investigación, han intentado establecer los mecanismos implicados en la inducción de la muerte neuronal, las modificaciones celulares y moleculares que conducen a la muerte y el diseño de estrategias terapéuticas para prevenir o disminuir el daño neuronal o incluso para promover la regeneración.

En el caso de los mecanismos de inducción de la muerte neuronal, el más referenciado tanto a nivel básico, como experimental y clínico es la **excitotoxicidad** inducida por el neurotransmisor excitador ácido glutámico (Glu), con el avance del conocimiento se ha logrado determinar que este mismo proceso puede ser inducido también por el ácido gamma-aminobutírico (GABA), y potenciado por otros neurotransmisores. Así, en este capítulo se revisará brevemente la participación del Glu y el GABA, en la inducción de la muerte neuronal excitotóxica y su relación con algunos padecimientos neurodegenerativos.

ACEPCIONES DEL TÉRMINO EXCITOTOXICIDAD

Después de que se estableciera claramente que el Glu podría ser considerado un neurotransmisor excitador; y antes de que se caracterizara la diversidad funcional y molecular de los receptores glutamatérgicos; J. W. Olney acuñó en 1971, el término de **excitotoxicidad** para referirse a la muerte neuronal producida por la sobre-activación de los receptores sensibles a Glu (Olney y col., 1971). La muerte neuronal, era inducida experimentalmente a través de la aplicación o administración de concentraciones elevadas de glutamato monosódico (Lucas y Newhouse, 1957; Olney, 1971; Garattini, 1979). Posteriormente, con los avances en las técnicas de biología molecular, la **excitotoxicidad** se definió no sólo como sobre-activación, sino también como sobre-expresión de los receptores glutamatérgicos (Mishra y col., 2001). En la actualidad, el término **excitotoxicidad** se utiliza para referirse de manera más amplia a la muerte neuronal que produce la excitación prolongada de las neuronas, ya sea a través de la activación directa de receptores sensibles a Glu, o por algún otro mecanismo, incluso por sobre-activación de receptores sensibles a GABA (Nuñez y col., 2003).

LA EXCITOTOXICIDAD MEDIADA POR ÁCIDO GLUTÁMICO

El Glu y el ácido aspártico (Asp) son dos aminoácidos dicarboxílicos, no esenciales, que se generan a través del metabolismo de la glucosa (Pasantes y col., 1991; Deutch y Roth, 1999). Ambos, forman parte de las proteínas, por lo que son prácticamente ubicuos en el organismo, sin embargo, dentro del sistema nervioso (SN) alcanzan concentraciones más elevadas que en el resto de los tejidos (Pasantes y col., 1991). Tanto el Glu, como el Asp, ejercen un efecto excitador potente sobre la mayoría de

las neuronas, en contraste con el efecto altamente depresor de sus respectivos productos de α -descarboxilación, el GABA y la β -alanina, respectivamente (Cotman y col., 1981)

Receptores sensibles a Glu

El Glu ejerce sus efectos excitadores a través de su interacción específica con receptores proteínicos ubicados a nivel de la membrana plasmática. Primordialmente, a través de canales iónicos activados por ligando (receptores ionotrópico), pero también puede interactuar con receptores acoplados con cadenas de señalización intracelular mediante proteínas G (receptores metabotrópicos).

Los **receptores ionotrópicos glutamatérgicos** (R-Glu_i) permiten la entrada de Na⁺ y Ca⁺⁺, así como la salida de K⁺; despolarizan rápidamente a la célula nerviosa; y se clasifican, con base en su afinidad por agonistas específicos, en receptores sensibles a: N-Metil-D-Aspartato (R-NMDA), ácido propiónico 3-amino-4-hidroxi-5-metil isoxasol (R-AMPA) y ácido kaínico (R-KA) (Watkins y Olverman, 1987; Lipton y Rosenberg, 1994; Simeone y col., 2004). Estructuralmente, son complejos macromoleculares oligoméricos formados por 4 subunidades polipeptídicas, cada una de las cuales, contiene tres dominios transmembranales (TM1, 3 y 4) y un bucle citosólico que penetra parcialmente a la membrana (TM2) y se alinea al poro iónico (Simeone y col., 2004; Vandenberghe y Brecht, 2004), de tal forma que para cada subunidad, el grupo amino terminal es extracelular y el carboxilo terminal es intracelular (Nakanishi, 1992; Barinaga, 1995). Las subunidades de los receptores ionotrópicos forman la región receptora de Glu, a través de dos bucles extracelulares largos que conforman el extremo amino terminal y la región espaciadora entre TM3 y TM4 (Wollmuth y Sobolevsky, 2004). La existencia de diferentes subunidades proteínicas específicas para cada uno de los subtipos de receptores a Glu, genera receptores funcionalmente diferentes, pero con afinidad por el mismo agonista endógeno, el Glu.

Los **R-NMDA** se caracterizan por su dependencia de voltaje, activándose más lentamente y en consecuencia de la activación de los otros tipos de R-Glu_i. Presentan una elevada permeabilidad a Ca⁺⁺, que dependiendo de su composición en subunidades, puede inactivarse lenta o rápidamente (Mayer y Westbrook, 1987; Popescu y Auerbach, 2003; Simeone y col., 2004). Además, poseen múltiples sitios

de regulación farmacológica, descritos como sitios de unión para: 1) el transmisor, sus agonistas y antagonistas competitivos; 2) la glicina (coagonista); 3) la fenciclidina y el MK801 o dizocilpina (bloqueadores del canal iónico); 4) el Mg^{++} (bloqueador del canal iónico sensible a voltaje); 5) el Zn^{++} (modulación positiva del canal); 6) las poliaminas (modulación positiva o negativa, dependiendo del compuesto y de la concentración del mismo); y 7) un sitio sensible a cambios de óxido reducción (118, 124, 126). Estructuralmente, este receptor se define como heterotetrámero de la subunidad NR1 (presente en ocho variantes de edición, denominadas NR1a-h) con las subunidades NR2A-D o NR3A-B, donde la presencia de NR1 determina la existencia de un canal funcional, mientras que NR2A-D y NR3A-B modifican las propiedades electrofisiológicas del canal (Mori y Mishina, 1995; Simeone y col., 2004).

Los **receptores no-NMDA** (R-AMPA y R-KA) son independientes de voltaje, tienen mayor permeabilidad al Na^+ , son los responsables de la transmisión sináptica excitadora rápida y están ampliamente distribuidos dentro del SN, lo mismo que los R-NMDA (Monaghan y col., 1989). Los R-AMPA, que también unen ácido kaínico pero con baja afinidad, se definen como tetrámeros homoméricos o heteroméricos de las subunidades GluR1-4, las cuales pueden expresarse en variantes de edición en el sitio Q/R, o como variantes de empalme alternativo, que modifican tanto la selectividad por el ligando como la permeabilidad del canal, no sólo en su cinética, sino también en el tipo de ión que penetra, ya que pueden permitir la entrada de Ca^{++} a la célula (Monaghan y col., 1989; Mori y Mishina, 1995; Bettler y Mülle, 1995; Simeone y col., 2004; Vandenberghe y Brecht, 2004). Por otro lado, los R-KA se definen como complejos homotetraméricos o heterotetraméricos de las subunidades GluR5-7 y KA1-2, proteínas que elevan la afinidad del receptor por el kainato (Monaghan y col., 1989; Henley, 1994; Vandenberghe y Brecht, 2004).

Los **receptores metabotrópicos glutamatérgicos** son proteínas integrales de membrana que se distribuyen en siete dominios transmembranales y que poseen dos largas porciones de aminoácidos hidrofílicos, una en el medio extracelular con el extremo amino y otra en el medio intracelular con el extremo carboxilo (Schoepp y Conn, 1993; Simeone y col., 2004). Estos receptores aparecen en el SN por lo menos en 8 subtipos conocidos como mGluR1-8, cuya activación en el caso de mGluR1 y mGluR5 (grupo I) se relaciona con la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) y la

producción de IP₃ y DAG; en tanto que, la activación de mGluR2-3 (grupo II) y mGluR4,6-8 (grupo III), inhibe a la adenilato ciclasa (AC) y reduce los niveles de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) (Schoepp y Conn, 1993; Pin y Duvoisin, 1995). Los R-mGlu del grupo I se ubican principalmente a nivel somatodendrítico; los del grupo II, en toda la superficie neuronal, incluso a nivel extrasináptico; y los del grupo III, en la terminal axónica. La activación de los R-mGlu tiene efectos variables, sin embargo de forma general se acepta que los del grupo I incrementan la excitabilidad neuronal, a través de la inhibición de varios canales de K⁺ activados por voltaje o Ca⁺⁺; en tanto que, los del grupo II y III, disminuyen la liberación de neurotransmisores, tales como el Glu y el GABA (Schoepp y Conn, 1993; Pin y Duvoisin, 1995; Simeone y col., 2004).

Excitotoxicidad mediada por Glu y enfermedades neurodegenerativas

En principio, la activación de los receptores glutamatérgicos, promueve la despolarización de la membrana, que al prolongarse produce un desequilibrio osmótico ocasionado por la entrada de Na⁺ y Cl⁻, el cual es seguido por la elevación masiva de la concentración citoplasmática de Ca⁺⁺ (Doble, 1999). La entrada de Na⁺ altera la dirección y funcionalidad de todos los transportadores, bombas y canales iónicos que dependen del gradiente de Na⁺ (Greene y Greenamyre, 1996; Doble, 1999). El influjo de Cl⁻, además de alterar diferentes mecanismos de transporte a nivel de la membrana plasmática, estimula la liberación de Glu y promueve la muerte neuronal por excitotoxicidad (Babot y col., 2005). Finalmente, el aumento excesivo de la concentración citoplasmática de Ca⁺⁺ promueve: **1)** la síntesis del óxido nítrico, el cual puede difundir a la terminal presináptica glutamatérgica y estimular la liberación de más Glu, a través de un mecanismo dependiente de GMPc (monofosfato cíclico de guanidina); **2)** la generación de radicales libres, peroxinitrito o superóxido, que promueven la lipoperoxidación y desestabilización de las membranas celulares; y **3)** la pérdida del potencial electroquímico mitocondrial, que suspende la fosforilación oxidativa y promueve la generación de radicales libres a nivel mitocondrial, hasta invalidar completamente el metabolismo energético mitocondrial. Además, al elevarse la concentración citoplasmática de Ca⁺⁺, diversas vías de señalización intracelular dependientes de proteínas cinasas o fosfatasa pueden activarse y promover la proteólisis del contenido citoplasmático (Greene y

Greenamyre, 1996; Montal, 1998; Arundine y Tymianski, 2003; para más detalles revisar los capítulos siguientes).

El proceso excitotóxico descrito anteriormente como un continuo, puede ser demasiado agudo en su fase inicial y desencadenar la muerte neuronal por **necrosis**, o evolucionar más lentamente y producir muerte neuronal por **apoptosis**. En este sentido, estudios *in vitro* han demostrado que el Glu puede generar diferentes procesos neurodegenerativos, dependiendo del esquema de aplicación (Bonfoco y col., 1995; Portera-Cailliau y col., 1997; Almeida y col., 1998). Así, exposiciones breves a concentraciones elevadas de Glu producen **muerte neuronal aguda**, con cambios neurodegenerativos inmediatos, como la inflamación edematosa del soma neuronal y las dendritas, así como cambios picnóticos del núcleo, en un proceso que se caracteriza por ser dependiente de Na⁺ y Cl⁻. En tanto que, la exposición prolongada a concentraciones menos elevadas de Glu produce **muerte neuronal retardada**, la cual depende del influjo de Ca⁺⁺ y requiere de varias horas para presentarse (Romano y col., 1995; Portera-Cailliau y col., 1997). Además, también se ha sugerido que el proceso degenerativo estimulado por Glu depende en gran medida del estado funcional inicial de la mitocondria. De esta forma, cuando existe una disminución en la tasa metabólica celular, la mitocondria es incapaz de mantener la homeostasis de Ca⁺⁺, presentándose la muerte neuronal por apoptosis (Almeida y col., 1998; Portera-Cailliau y col., 1997).

Los estudios realizados en diferentes sistemas neuronales, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre la degeneración excitotóxica mediada por Glu; y las demostraciones de que la concentración extracelular de Glu se eleva significativamente, en diversas condiciones patológicas; han permitido establecer que este mecanismo participa en la muerte neuronal que se produce por: hipoxia-isquemia cerebral (Choi y Rothman, 1990), trauma cráneo encefálico cerebral (Bramlett y Dietrich, 2004; Wagner y col., 2005), epilepsia (Meldrum, 1993a; Friedman y col., 2003) y envenenamiento con domoato (Meldrum, 1993b; Jeffery, 2004). Además, se ha propuesto que la excitotoxicidad participa en el establecimiento de diversos padecimientos neurodegenerativos como las enfermedades de Huntington (Beal y col., 1991; Gardian y Vecsei, 2004), Alzheimer (Ferrarese y col., 2000; Hynd y col., 2004) y Parkinson (Lipton y Rosenberg, 1994; Rego y Oliveira, 2003); así como en la esquizofrenia (Lipton y Rosenberg, 1994).

En este sentido, diversos estudios experimentales han demostrado que el uso de antagonistas glutamatérgicos pueden proteger del daño neuronal excitotóxico, disminuir la neurodegeneración e incluso evitar las crisis convulsivas (Meldrum, 1985; Izumi y col., 1991; Kaku y col., 1993; Morales-Villagrán y col., 1996). En la clínica, este conocimiento ha sido aplicado con relativo éxito y, por ejemplo, la memantina, uno de los agentes terapéuticos, utilizados recientemente para la enfermedad de Alzheimer, aunque no cura la enfermedad, sí retrasa su progresión, al actuar como antagonista del R-NMDA (Moreira y col., 2010; Supnet y Bezprozvanny, 2010). Otro ejemplo, lo constituye la dizolcipina, también antagonista del mismo receptor, que al aplicarse de manera combinada con nimodipina, en la fase aguda del daño excitotóxico generado por un evento hipoxi-isquémico ha probado disminuir el área de la zona de penumbra, aunque sus efectos neuroprotectores son variables y en algunos casos, poco significativos (Niizuma y col., 2010; Sydlowska y Tymianski, 2010).

EXCITOTOXICIDAD MEDIADA POR GABA

El GABA, descubierto en 1950 por Eugene Robert (Deutch y Roth, 1999), es un aminoácido neutro, no proteínico, carente de carbón asimétrico, que se forma a partir de la α -descarboxilación de Glu por acción de la descarboxilasa del ácido glutámico (Pasantes y col., 1991; Martin y Rimvall, 1993). El GABA también tiene una distribución amplia en el organismo, sin embargo, su concentración intracerebral es mayor (Tapia, 1983); y dentro del cerebro maduro, se encuentra prácticamente en todas las regiones, donde ejerce un control amplio sobre la excitabilidad neuronal, por lo que se ha llegado a considerar el principal neurotransmisor inhibitor del SN de mamíferos en la etapa adulta (Wu, 1983).

En la mayoría de las regiones cerebrales, las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas convergen, las primeras funcionando como neuronas principales de proyección y, las segundas, como interneuronas de morfología variable (Ureña-Guerreo y col., 2009). Aunque, en algunas regiones, las neurona GABAérgicas también pueden funcionar como neuronas de proyección corta, por ejemplo, en el cuerpo estriado o en el cerebelo (Tapia, 1983; Wu, 1983; Martin y Rimvall, 1993; Ureña-Guerrero y col., 2009).

Receptores GABAérgicos

Los efectos neuronales del GABA dependen de su interacción con receptores específicos, los cuales se han clasificado en dos tipos, conocidos como receptores GABA_A y GABA_B. Esta clasificación se basa en la respuesta farmacológica de los receptores a diferentes agonistas, de tal forma que aquellos son sensibles al bloqueo por bicuculina se consideran GABA_A, mientras que los que no son bloqueados por bicuculina, pero se activan en presencia de baclofen se consideran GABA_B (Bormann, 1988; Burt y Kamatchi, 1991).

Los **receptores GABA_A** (R-GABA_A), son ionotrópicos, es decir cuentan con un canal iónico acoplado a su estructura, el cual permite la difusión facilitada de Cl⁻ durante la activación del receptor (Bormann, 1988). Además, estos receptores poseen sitios de unión sensibles a benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides, anestésicos, convulsionantes y anticonvulsionantes (Burt y Kamatchi, 1991). Estructuralmente, los R-GABA_A son similares a otros receptores ionotrópicos, es decir, se componen de cinco subunidades proteínicas cada una de las cuales posee cuatro dominios transmembranales (Burt y Kamatchi, 1991; Rudolph y Möhler, 2004). Hasta el momento, se han identificado 8 familias génicas, que dan origen a 21 subunidades proteínicas que pueden conformar al R-GABA_A y que son las siguientes: α 1-6, β 1-4, γ 1-4, δ , ϵ , π , θ y ρ 1-3 (Kardos, 1999; Lujan y col., 2005). Sin embargo, *in vivo*, la mayoría de los R-GABA_A post-sinápticos, se componen de las subunidades 2 α 1-2, 2 β y 1 γ 2 (Rudolph y Möhler, 2004; Lujan y col., 2005). El tipo de subunidades proteínicas que conforma el canal R-GABA_A determina, tanto la afinidad por diferentes sustratos, como las propiedades cinéticas de la conductancia a Cl⁻ (Rudolph y Möhler, 2004; Lujan y col., 2005). Cabe hacer mención, que este tipo de receptor no se ha detectado a nivel pre-sináptico, pero sí puede encontrarse fuera de la sinapsis (Rudolph y Möhler, 2004).

Por otro lado, el **receptor GABA_B** (R-GABA_B), es de tipo metabotrópico y regula directamente, los canales de Ca⁺⁺ e indirectamente, los canales de K⁺, a través de la activación de proteínas G y la producción de segundos mensajeros. La interacción del GABA con este receptor promueve la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), que produce ácido araquidónico (AA), el cual activa a la proteína cinasa C (PKC), que fosforila a los canales Ca⁺⁺ inactivándolos, para disminuir la liberación de

neurotransmisores. Las corrientes de K^+ se afectan como consecuencia del cierre de los canales de Ca^{++} (Bormann, 1988). Los R-GABA_B se encuentran tanto a nivel pre-sináptico como post-sináptico, donde participan en la modulación de la actividad de otros receptores, incluyendo a los R-GABA_A (Kardos, 1999; Hahner y col., 1991). Molecularmente, se han identificado dos tipos de subunidades: GABA_{B1} y GABA_{B2}; y para la proteína GABA_{B1} se conocen, al menos, cinco variantes de edición (GABA_{B1a-e}) (Lujan y col., 2005). Algunos trabajos, sugieren que la activación del R-GABA_B depende de un proceso de heterodimerización (Bowery y col., 2002). Sin embargo, estudios recientes, demostraron que existen etapas del desarrollo embrionario y posnatal, donde ambas subunidades no se expresan juntas, sino de manera diferencial (Martin y col., 2005).

Excitación neuronal por activación del R-GABA_A

A principios de la década de 1990, se demostró que la activación excesiva de los R-GABA_A ubicados en las dendritas distales de las células piramidales de CA1 en el hipocampo, producía despolarización más que hiperpolarización, al parecer a través de un mecanismo que implica el movimiento de bicarbonato (Cherubini y col., 1991; Staley y col., 1995). Estas observaciones empezaron a modificar el esquema clásico del GABA como neurotransmisor inhibitorio. Posteriormente, se demostró que en etapas tempranas del desarrollo la activación de los R-GABA_A produce excitación neuronal (Cherubini y col., 1991; Ben-Ari, 2001). Así, a lo largo de los últimos veinte años, se han caracterizado las condiciones bajo las cuales se produce esta excitación neuronal.

Como se mencionó anteriormente, la activación del R-GABA_A permite la difusión facilitada de Cl^- a través de su estructura. Así, el Cl^- difunde a través de la membrana de acuerdo con su gradiente de concentración, el cual se establece fundamentalmente a través de la actividad de los **transportadores de Cl^-** , KCC2 y NKCC1, los cuales son transportadores simultáneos que acoplan el transporte activo de Cl^- , al movimiento pasivo de sodio (Na^+) o de potasio (K^+) (Khazipov y col., 2004; Ben-Ari, 2006; Kahle y col., 2008). **KCC2** transporta el Cl^- hacia fuera de la célula como cotransportador K^+/Cl^- , funciona en condiciones isotónicas, está restringido a las membranas neuronales y en el hipocampo de la rata, se empieza a expresar en el día posnatal 6 (Ben-Ari y col., 2007). En cambio, **NKCC1** transporta el Cl^- hacia

adentro de la célula como cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, funciona en condiciones de inflamación celular, se expresa en diferentes tipos celulares y en el hipocampo de la rata se expresa desde la edad embrionaria y disminuye sus niveles de expresión durante la edad posnatal (Dzhala y col., 2005; Ben-Ari, 2006; Kahle y col., 2008). Así, en la edad neonatal la concentración intracelular de Cl^- es mayor (25mM) que la extracelular, por lo que al activarse el R-GABA_A, el Cl^- sale de la célula, despolarizándola y produciendo excitación. En cambio, en la edad adulta, la concentración intracelular de Cl^- es menor (7 mM) que la extracelular, por lo que al activarse el R-GABA_A, el Cl^- entra a la célula, hiperpolarizándola y produciendo inhibición (Ben-Ari, 2006; Kahle y col., 2008). De esta forma, la participación de los transportadores de cloro KCC2 y NKCC1 es esencial en la trasmutación del GABA, de excitador a inhibidor, y modificaciones en niveles y cursos temporales de expresión de los mismos podría relacionarse con algunas patologías, tal y como se ha observado en el daño hipoxi-isquémico (Douglas y col., 2007) y en la epilepsia (Dzhala y col., 2005).

Excitotoxicidad mediada por GABA y enfermedades neurodegenerativas

Actualmente, se conoce que la excitación neuronal mediada por GABA a través de la activación del R-GABA_A, puede promover la activación de canales de Ca^{++} sensibles a voltaje y favorecer la muerte neuronal por apoptosis, cuando se sobre-activa dicho receptor (Nuñez y col., 2003). En este sentido, se demostró que la administración sistémica de muscimol (agonista selectivo del R-GABA_A) en ratas recién nacidas, disminuye la densidad de las neuronas en el hipocampo y las capacidades cognitivas, evaluadas en la eta adulta. También se demostró, que este tipo de muerte es similar a la que producen los análogos glutamatérgicos AMPA y KA, que es de tipo apóptotico y que depende de las condiciones que regulan la expresión del transportador NKCC1 a la alta, tales como el estradiol y el BDNF (Nuñez y McCarty, 2004). Interesantemente, estudios *in vitro* han demostrado que la aplicación simultánea de muscimol y KA, produce menor pérdida neuronal que cuando se administran solos, esto debido a que en combinación se promueve un aumento en la expresión de la proteína amortiguadora de Ca^{++} , calbindina (Hilton y col., 2005).

Particularmente, dos desórdenes neurológicos han sido estrechamente relacionados con la excitación mediada por GABA, la isquemia (Douglas y col., 2007) y la epilepsia

(Dzhala y col., 2005; Bragin y col., 2009). En ambas condiciones, se ha reportado un aumento significativo en los niveles de expresión del transportador NKCC1; y existen resultados experimentales, que sugieren que la bumetanida un bloqueador del transporte de Cl⁻, a través de este transportador, tiene efectos neuroprotectores y anticonvulsivos (Dzhala y col., 2005; Bragin y col., 2009). Dichos resultados, han conducido incluso a la evaluación preclínica de la bumetanida como fármaco antiepiléptico.

Es probable, que con el avance del conocimiento, se logró determinar en qué grado participa la excitotoxicidad mediada por GABA, en los procesos neurodegenerativos, que antes se atribuían básicamente a la excitotoxicidad mediada por Glu. Dicha condición, evidentemente permitirá mejorar los abordajes terapéuticos de las enfermedades neurodegenerativas. Además, debe considerarse que en estos procesos neurodegenerativos participan además de la excitotoxicidad, la inflamación celular, mecanismo en el cual tienen una participación muy importante las células gliales, principalmente astrocito y microglía, ambas con receptores a ambos neurotransmisores.

REFERENCIAS

1. Almeida A, Heales SJR, Bolaños JP, Medina JM (1998) Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res* 790:209-216.
2. Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325-337.
3. Babot Z, Cristofol R, Suñol C (2005) Excitotoxic death induced by releases glutamate in depolarised primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci* 21:103-112.
4. Barinaga M (1995) A new face for the glutamate receptor. *Science* 267:177-1778.
5. Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW (1991) Chronic quinolenic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 13:4181-4192.
6. Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends in Neurosci* 24:353-360.
7. Ben-Ari Y (2006) Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain. *Epileptic Disord* 8:91-102.
8. Bettler B, Mülle C (1995) Review: Neurotransmitter Receptors II. AMPA and Kainate Receptors. *Neuropharmacology* 34:123-139.
9. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7152-7166.
10. Bormann J (1988) Electrophysiology of GABAA y GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci* 11:112-116.
11. Bragin DE, Sanderson JL, Peterson S, Connor JA, Müller WS (2009) Development of epileptiform excitability in the deep entorhinal cortex after status epilepticus. *Eur J Neurosci* 30(4):611-24.
12. Bramlett HM, Dietrich WD (2004) Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:133-150.

13. Bowery NG, Bettler B, Frostl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002). International Union of Pharmacology XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acidB receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 54:247-264.
14. Burt DR, Kamatchi GL (1991) GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J* 5:2916-2923.
15. Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 14:515-519.
16. Choi CW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.
17. Cotman CW, Foster A, Lanthorn T (1981) An overview of glutamate as a neurotransmitter. En: *Glutamate as a neurotransmitter* (Di Chiara G, Gessa, GL, eds.) Raven Press, New York, p.p. 1-27.
18. Deutch AY, Roth RH (1999) Neurotransmitters, En: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom MD, Roberts JL, Landis SC, Squire LR, eds.) Academic Press, New York, p.p.193-234.
19. Doble A (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81:163-221.
20. Dzhalal VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ. 2005. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11(11):1205-13.
21. Ferrarese C, Begni B, Canevari C, Zoia C, Piolti R, Frigo M, Appollonio I, Frattola L (2000) Glutamate uptake is decreased in platelets from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* 47:641-3.
22. Friedman LK, Veliskova J, Kaur J, Magrys BW, Liu H (2003) GluR2B knockdown accelerates CA3 injury after kainate seizures. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:733-750.
23. Garattini S (1979) Evaluation of the neurotoxic effects of glutamic acid. En: *Nutrition and the Brain*, Vol. 4 (Wurtman RJ, Wurtman JJ, eds.) Raven Press, New York, p.p.79-116.
24. Gardian G, Vecsei L (2004) Huntington's disease: pathomechanism and therapeutic perspectives. *J Neural Transm* 111:1485-1494.
25. Greene JG, Greenamyre JT (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 48:61-634.
26. Hahner L, McQuilkin S, Harris RA (1991) Cerebellar GABAB receptors modulate function of GABAA receptors. *FASEB J* 5:2466-2472.
27. Henley JM (1994) Kainate-binding proteins: phylogeny, structures and possible functions. *Trends Pharmacol Sci* 15:182-190.
28. Hilton GD, Ndubuizu A, Nunez JL, McCarthy MM (2005) Simultaneous glutamate and GABA(A) receptor agonist administration increases calbindin levels and prevents hippocampal damage induced by either agent alone in a model of perinatal brain injury. *Dev Brain Res* 159(2):99-111.
29. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45:583-595.
30. Izumi Y, Clifford DB, Zorumski CF (1991) 2-Amino-3-phosphonopropionate blocks the induction and maintenance of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 122:187-190.
31. Jeffery B, Barlow T, Moizer K, Paul S, Boyle C (2004) Amnesic shellfish poison. *Food Chem Toxicol* 42:545-57.
32. Kaku DA, Giffard RG, Choi DW (1993) Neuroprotective effects of glutamate antagonists and extracellular acidity. *Science* 260:1516-1518.
33. Kardos J (1999). Recent advances in GABA research. *Neurochem Int* 34:353-358.
34. Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL (2004) Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 19:590-600.
35. Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* 4(9):490-503.
36. Kintner DB, Luo J, Gerdtz J, Ballard AJ, Shull GE, Sun D. Role of Na/K/Cl cotransport and Na/Ca2 exchange in mitochondrial dysfunction in astrocytes following in vitro ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1113-C1122.
37. Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng J Med* 330:613-622.
38. Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 58:193-204.

39. Lujan R, Shigemoto AR, Lopez-Bendito G (2005). Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130:567-580.
40. Martin DL, Rimvall K (1993) Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem* 60:395-407. Martin SC, Steiger JL, Gravielle MC, Lyons HR, Russek SJ, Farb DH (2004). Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit mRNAs in the developing nervous system and receptor coupling to adenylyl cyclase in embryonic neurons. *J Comp Neurol* 473:16-29.
41. Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28:197-276.
42. Meldrum B (1993a) Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathol* 3:405-412.
43. Meldrum B (1993b) Amino acids as dietary excitotoxins: a contribution to understanding neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 18:293-314.
44. Meldrum B (1985) Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. *Clin Sci* 68:118-122.
45. Mishra OP, Fritz KI, Delivoria-Papadopoulos M (2001) NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7:249-253.
46. Monaghan DT, Bridges JR, Cotman CW (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365-402.
47. Morales-Villagran A, Ureña-Guerrero ME, Tapia R (1996) Protection by NMDA receptor antagonist seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur J Pharmacol* 305:87-93.
48. Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, Smith MA, Perry G. (2010) Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 1802(1):2-10.
49. Mori H, Mishina M (1995) Review: Neurotransmitter Receptors VIII. Structure and Function of the NMDA Receptor Channel. *Neuropharmacology* 34:1219-1237.
50. Montal M (1998) Mitochondria, glutamate neurotoxicity and death cascade. *Biochim Biophys Acta* 1366:113-126.
51. Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implication for brain function. *Science* 258:597-603.
52. Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, Jung JE, Katsu M, Okami N, Chan PH (2010) Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1802(1):92-9.
53. Nuñez JL, Alt JJ, McCarthy MM (2003) A new model for prenatal brain damage. I. GABAA receptor activation induces cell death in developing rat hippocampus. *Exp Neurol* 181(2):258-69.
54. Nuñez JL, McCarthy MM (2004) Cell death in the rat hippocampus in a model of prenatal brain injury: time course and expression of death-related proteins. *Neuroscience* 129(2):393-402.
55. Olney JW (1971) Glutamate induces neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J Neurophat Exp Neurol* 30 :75-90.
56. Olney JW, Ho OL, Rhee V (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 14:61-76.
57. Pasantes H, Sánchez J, Tapia R (1991) *Neurobiología Celular, SEP/FCE, México*, p.p. 167-180.
58. Pin JP, Duvoisin R (1995) Review: Neurotransmitter receptors I. The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
59. Popescu G, Auerbach A (2003) Modal gating of NMDA receptors and the shape of their synaptic response. *Nat Neurosci* 6:476-783.
60. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1997b) Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal death in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Com Neurol* 378:88-104.
61. Rego AC, Oliveira CR (2003) Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 28:1563-1574.
62. Romano C, Price MT, Olney JW (1995) Delayed excitotoxic neurodegeneration induced by excitatory amino acid agonists in isolated retina. *J Neurochem* 65:59-67.
63. Rudolph U, Möhler H (2004). Analysis of GABA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 44:475-498.
64. Schoepp DD, Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 14:13-20.

65. Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM (2004) Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in mammalian central nervous system. *J Child Neurol* 19:343-360.
66. Supnet C, Bezprozvanny I (2010) The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell Calcium* 47(2):183-9.
67. Staley KJ, Soldo BL, Proctor WR (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science* 269:977-981.
68. Szydlowska K, Tymianski M (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47:122-9.
69. Tapia R (1983) El ácido γ -aminobutírico. En: *Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas* (Pasantés-Morales H, Aréchiga H, eds.), UNAM, México, p.p. 57-70.
70. Ureña-Guerrero ME, Orozco-Suárez S, López-Pérez SJ, Flores-Soto ME, Beas-Zárate C (2009) Excitotoxic neonatal damage induced by monosodium glutamate reduces several GABAergic markers in the cerebral cortex and hippocampus in adulthood. *Int J Dev Neurosci* 27(8):845-55.
71. Vandenberghe W, Brecht DS (2004) Early events in glutamate receptor trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 16:134-139.
72. Wagner AK, Fabio A, Puccio AM, Hirschberg R, Li W, Zafonte RD, Marion DW (2005) Gender associations with cerebrospinal fluid glutamate and lactate/pyruvate levels after severe traumatic brain injury. *Crit Care Med* 33:407-413
73. Watkins JC, Olverman H (1987) Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci* 10:265-272.
74. Wollmuth LP, Sobolevsky AI (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 27:321-328.
75. Wu JY (1983) Immunocytochemical identification of GABAergic neurons and pathways. En: *Glutamine, glutamate and GABA in the Central Nervous System* (Hertz L, Kvamme E, McGeer EG, Schousboe A, eds.), Liss, New York, p.p. 161-176.

2

MECANISMOS MOLECULARES DE EXCITOTOXICIDAD EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y SUS IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

López-Meraz LM, Álvarez-Croda DM, Galán-Zamora R, Manzo J.

Programa de Neurobiología, Dirección General de la Unidad de Estudios de Posgrado, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas incluyen a un grupo de trastornos neurológicos que se caracterizan precisamente por la pérdida de neuronas o muerte neuronal en ciertas regiones cerebrales. Los representantes más estudiados de este grupo de enfermedades, aunque no por ello los más importantes, son las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington. En el presente capítulo se revisarán los principales mecanismos moleculares que se propone son responsables de los procesos de neurodegeneración en estos trastornos del sistema nervioso central, así como algunas estrategias terapéuticas, ya sea en uso o propuestas, que se derivan precisamente del conocimiento de dichos procesos. Sin embargo, incluiremos también, evidencia que sugiere que la epilepsia, aunque no contemplada oficialmente dentro de este grupo, comparte con las primeras ciertos mecanismos de muerte neuronal. Es importante destacar que la manifestación clínica de los síntomas en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, se presenta cuando ya existe una pérdida neuronal franca. Por tal motivo, es por demás importante entender por qué y cómo las neuronas mueren, para eventualmente tratar de contrarrestar estos procesos y detener el desarrollo de la enfermedad. En una revisión realizada recientemente, se muestra que existen vías metabólicas y de señalización, así como procesos celulares que se encuentran alterados y son comunes a varias enfermedades neurodegenerativas. Entre éstos destacan: la

acumulación de proteínas con enrollamiento anormal, la formación de agregados fibrilares, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, el daño mitocondrial y la activación de vías de muerte celular (40).

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

La EA es la alteración neurodegenerativa de mayor incidencia. Los sujetos que la padecen presentan deterioro cognitivo progresivo y demencia, presentándose comúnmente después de los 65 años de edad (48). A nivel histopatológico, el cerebro del paciente con EA presenta placas amiloideas y marañas neurofibrilares, principalmente en la corteza cerebral y el hipocampo (67). La EA se considera multifactorial, y dentro de sus causas se postulan al menos dos vertientes: en la forma familiar, se han detectado mutaciones en los genes que codifican para las presenilinas-2 y -1 y para la proteína precursora del amiloide (PPA) (53); mientras que en la forma esporádica, se sugiere la participación de procesos excitotóxicos y de daño oxidativo (8, 33, 44). Uno de los principales inconvenientes a los que se ha enfrentado el estudio de la EA es la carencia de modelos experimentales *in vivo* que reproduzcan la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo, estudios realizados en muestras *post-mortem* de humanos, en ratones con mutaciones genéticas y en cultivos celulares, ha sido invaluable para tratar de entender los mecanismos de neurodegeneración.

Las placas amiloideas se localizan extracelularmente y están conformadas por el péptido beta amiloideo (β A) de 42 aminoácidos, el cual es un fragmento proteolítico insoluble de la PPA (18). En su génesis participan las enzimas β -secretasa (BACE, por sus siglas en inglés) y la γ -secretasa (presenilinas y nicastrina) (25). Por su parte, las marañas neurofibrilares se componen de la proteína Tau hiperfosforilada. Se propone que el β A insoluble promueve un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ERO) y del calcio intracelular, favoreciendo así la actividad en proteínas cinasas responsables de dicha fosforilación (19, 47). Recientemente, Tamagno y colaboradores propusieron que existe una retroalimentación positiva entre el estrés oxidativo y las γ - y β -secretasas, ya que en cultivos celulares, condiciones de estrés promueven su expresión y aumentan su actividad, por un mecanismo que involucra a las presenilinas y que requiere la presencia del PPA, lo que a su vez aumentaría la producción del β A (71).

Una hipótesis que trata de explicar la neurodegeneración en la EA contempla a la excitotoxicidad mediada por glutamato (3). Tras la activación de receptores NMDA, existe un aumento del calcio citosólico, lo que activa enzimas dependientes de calcio como la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa y fosfolipasas, que a su vez favorecen la producción de ERO, de especies reactivas de nitrógeno (ERN) y radicales libres como superóxido (O_2^{\bullet}), peroxinitrito ($ONOO^-$) e hidroxilo (OH^{\bullet}), entre otros, causando eventualmente muerte neuronal (14, 33). Lo anterior promueve el mantenimiento de las condiciones que causan muerte celular. Resulta importante mencionar que recientemente se demostró que oligómeros de βA causan una sobreactivación de receptores NMDA y AMPA, saturación de calcio y daño mitocondrial y la consecuente muerte neuronal en cultivos organotípicos de hipocampo (2). También se plantea que en la EA puede existir disfunción mitocondrial por acción de los radicales libres, lo que entre otros aspectos, altera la actividad de la citocromo oxidasa, la homeostasis del calcio y mecanismos apoptóticos (10, 67, 31, 65, 86). Ver figura 1.

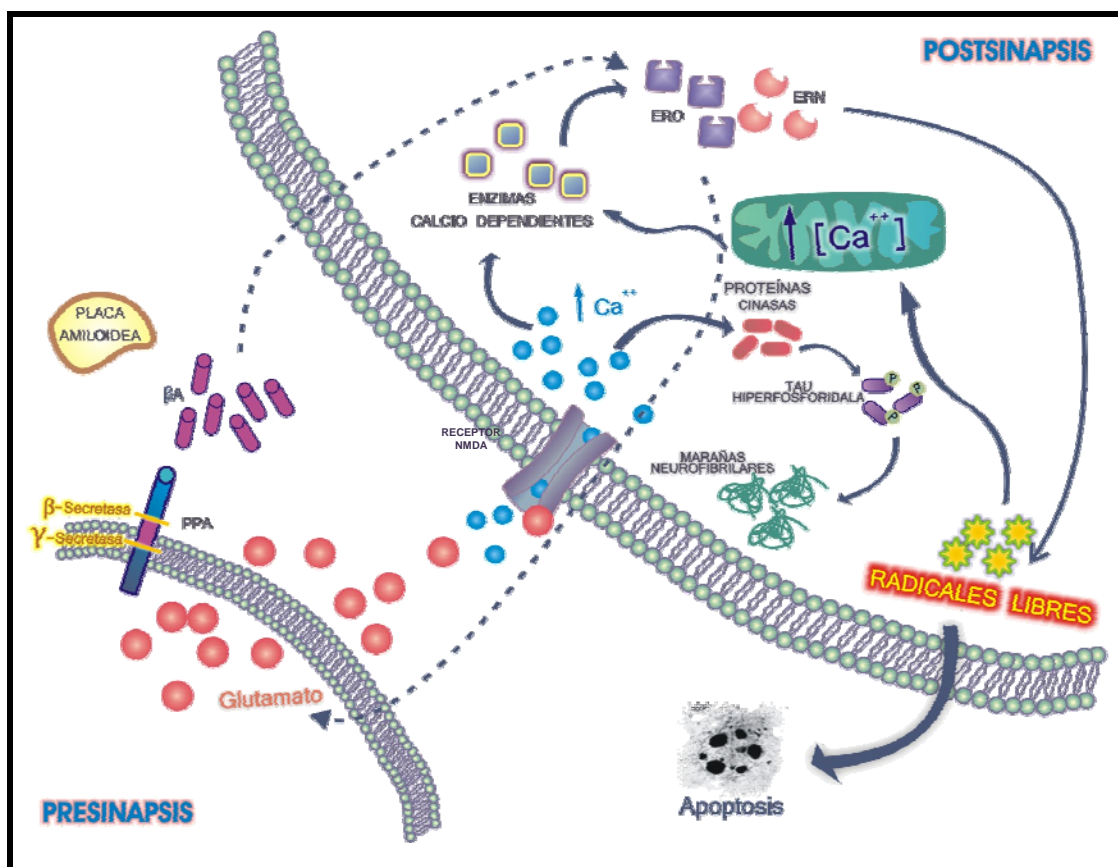


Figura 1. Esquema representativo de los mecanismos moleculares propuestos en la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer.

ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP)

La característica neuropatológica principal de la EP es la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta. El consecuente déficit de dopamina (DA) causa hiperactividad en el núcleo subtalámico y el globo pálido originando los síntomas motores característicos de la enfermedad (45). El origen preciso de la EP se desconoce, pero existe una forma hereditaria vinculada a mutaciones en genes que codifican para la proteína α -sinucleína (autosómica dominante), la parkina y la cinasa PINK1 (autosómica recesiva); y la EP denominada esporádica, sin predisposición genética determinada (54). Respecto a la causa precisa de la muerte de las neuronas dopaminérgicas se desconoce; sin embargo, los principales mecanismos propuestos hasta hoy en día incluyen la formación de agregados de α -sinucleína (principal componente de los cuerpos de Lewy), la disfunción mitocondrial, el compromiso metabólico por la deficiencia de enzimas mitocondriales, el estrés oxidativo y la excitotoxicidad (50, 68, 83).

La α -sinucleína es una proteína citoplasmática importante para la integridad sináptica y la mutación en el gen que la codifica afecta los procesos proteolíticos y de agregación de la proteína, resultando en su acumulación y formación de agregados fibrilares en las células dopaminérgicas, pudiendo esto causar la muerte neuronal en la EP (11, 32, 68). Recientemente se reportó que la α -sinucleína causa la muerte de células hipocampales en cultivo, a través de la activación de la caspasa-3 e involucrando al óxido nítrico (1). Por su parte, la parkina, una ubiquitina-proteína ligasa y la PINK1, una cinasa Ser/Thr mitocondrial, están implicadas en el recambio de las mitocondrias dañadas, de manera que las proteínas mutadas podrían causar la “acumulación” de mitocondrias defectuosas y finalmente la muerte neuronal (80). Por otro lado, para contribuir al estudio de los mecanismos involucrados en la neurodegeneración de la EP, se han diseñado diferentes modelos experimentales *in vivo*, que semejan la pérdida de neuronas dopaminérgicas, tal es el caso de la administración intracerebral de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (26, 36, 77) y de 6-hidroxi-dopamina (6-OH-DA), una neurotoxina catecolaminérgica (26, 36). El MPTP da lugar a un metabolito activo el MPP⁺, una toxina mitocondrial selectiva de neuronas dopaminérgicas ya que entra a éstas a través del transportador de DA e inhibe el complejo mitocondrial I (26, 36, 77), lo que resulta en aumento del estrés oxidativo y la generación de radicales libres, de los niveles de

calcio intracelular, así como una disminución de la producción de energía y la activación de las caspasas -3, -8 y -9, lo que finalmente causaría la muerte neuronal (29, 37, 75, 79). De manera similar, la 6-OH-DA disminuye la actividad del complejo mitocondrial I, e incrementa la activación de caspasa-3 (66); mientras que la exposición a rotenona, otro inhibidor del complejo mitocondrial I, produce fenotipos similares en roedores y agregados de α -sinucleína (38, 63).

La excitotoxicidad también se ha propuesto como la causa de la muerte neuronal en la EP, ya que se ha observado un aumento en los niveles extracelulares de glutamato y de la afinidad de sus transportadores, en condiciones experimentales que producen daño neuronal en la sustancia negra (42, 41, 81). Finalmente, otros estudios apoyan la hipótesis de que una sustancia endógena, derivada del aminocromo (que se forma durante la oxidación de la DA) puede ser la responsable de la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP (13, 50). El aminocromo participa en la polimerización con otras moléculas que contienen aminocromo, incluyendo proteínas, lípidos y metales; estabiliza la formación de las protofibrillas de α -sinucleína, en reacciones de óxido reducción que originan al radical leucoaminocromo o-semiquinona, altamente tóxico y propuesto como el neurotóxico que induce la neurodegeneración dopaminérgica en la EP, al disminuir la síntesis de ATP y fomentar la generación de radicales libres (49, 50, 62). Ver figura 2.

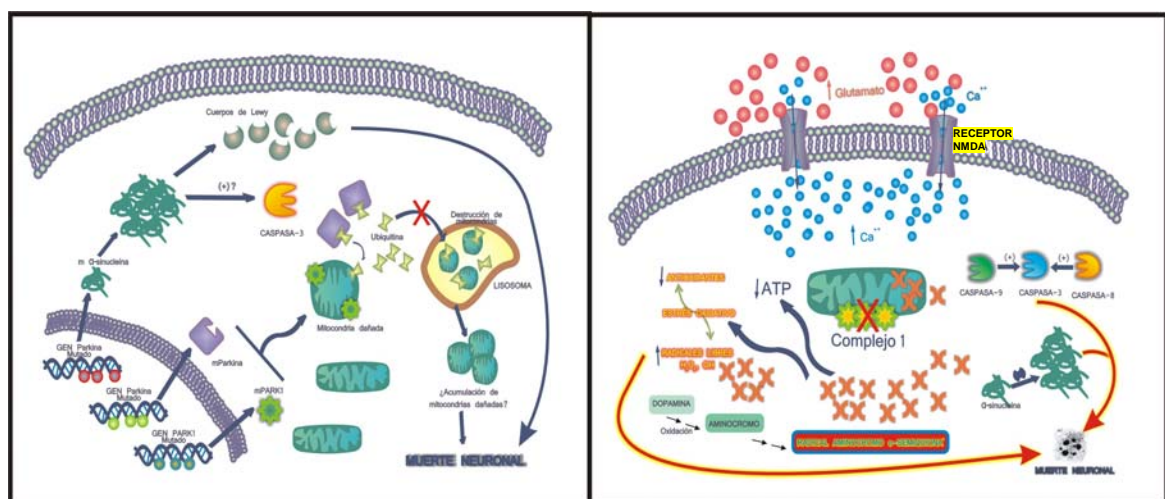


Figura 2. Diagrama representativo de los mecanismos moleculares que se han involucrado en los procesos de muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson, haciendo alusión a la forma familiar (izquierda) y a la esporádica (derecha).

ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH)

La EH se caracteriza por la presencia de una corea, que empeora con el paso del tiempo, así como por alteraciones cognitivas y psiquiátricas (6). A diferencia del resto de las enfermedades neurológicas aquí revisadas, la EH posee una clara causa genética y por ende es hereditaria. La mutación genética en la EH da lugar a la expansión del trinucleótido CAG que codifica para glutamina en el gen de la proteína huntingtina (htt), lo que origina una proteína “poliglutaminada” y cuyos repetidos de CAG pueden variar de 36 a 121 (huntingtina mutada, mhht) (73). Los ganglios basales, son las principales regiones cerebrales afectadas en la EH, aunque no las únicas (6, 24). Por esta razón, en esta revisión nos enfocaremos a mecanismos implicados en la muerte neuronal de las neuronas estriatales y que se han obtenido empleando modelos experimentales (genéticos o utilizando neurotóxicos como el ácido quinolínico, un agonista de los receptores NMDA) y muestras obtenidas de humanos con la EH. La acumulación y agregación de la mhht en las neuronas promueve un mal funcionamiento celular que eventualmente causa su muerte y que aunque aún se desconocen los mecanismos precisos, puede deberse a estrés oxidativo, alteraciones en la regulación transcripcional, excitotoxicidad mediada por glutamato, disfunción mitocondrial y falla energética, así como la activación de señales apoptóticas (30, 17).

Las evidencias proponen que la pérdida neuronal en la EH se puede explicar a partir de la hipótesis excitotóxica que implica un exceso en la liberación de glutamato por parte de las neuronas corticales e hipersensibilidad de los receptores NMDA presentes en neuronas del estriado, causando su muerte (17). Lo anterior es apoyado por la disminución estriatal de receptores a NMDA detectada en estudios de unión a radioligando en muestras *post-mortem* de pacientes con EH, considerando que las neuronas con un alto número de estos receptores son las más sensibles a morir por excitotoxicidad (87). Así mismo, toda una línea de investigación favorece la hipótesis de que metabolitos de la vía de la kinurenina para la degradación del triptófano participan en el proceso neurodegenerativo de la EH, al favorecer la formación de la 3-hidroxi-kinurenina, un generador de radicales libres y del ácido quinolínico, que actúa como agonistas de los receptores NMDA (60). Ambas hipótesis son apoyadas por hecho de que el ácido quinolínico reproduce la patología estriatal y algunos de las alteraciones motoras observadas en la EH (5).

Por otro lado, numerosos estudios en modelos experimentales y humanos respaldan el papel primordial del estrés oxidativo en la neurodegeneración propia de la EH (28, 51, 61). Así, se ha identificado que los sistemas celulares de óxido-reducción están alterados, lo que implica la formación masiva de ERO y ERN como el anión superóxido, que eventualmente darán lugar al radical peroxinitrito al reaccionar con el óxido nítrico, producido por un aumento en la actividad de la sintasa de óxido nítrico (51, 52); la disminución de antioxidantes endógenos, ya sea enzimáticos como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, o no enzimáticos, tal como el glutatión reducido; y peroxidación lipídica (28,51). Respecto a vías de señalización de muerte celular, los estudios realizados en modelos *in vivo* e *in vitro*, así como a partir de muestras humanas, sugieren la participación del citocromo c y de las caspasas-1 y -3 en los mecanismos de neurodegeneración en la EH (82, 78, 88). Ver figura 3.

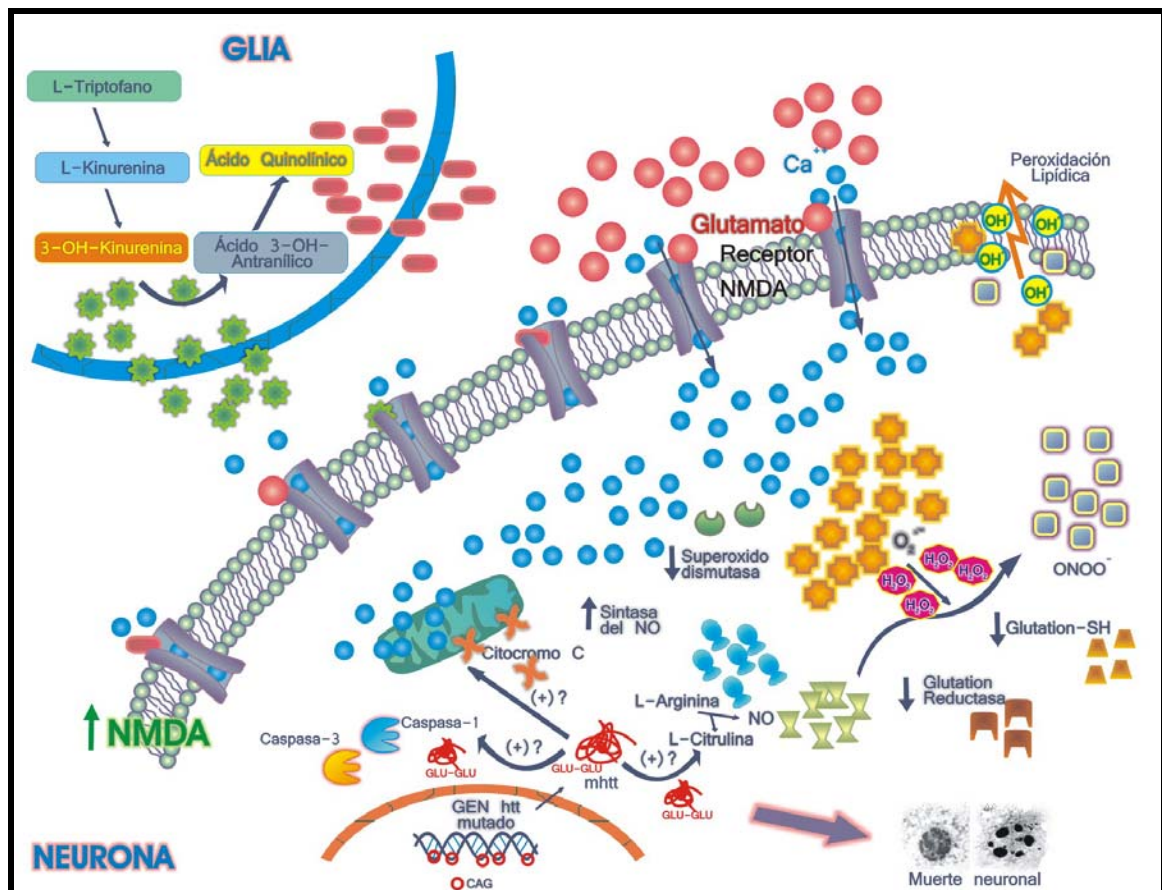


Figura 3. Representación gráfica de los mecanismos moleculares implicados en la muerte neuronal en la enfermedad de Huntington.

EPILEPSIA

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es la forma más común de epilepsia humana, siendo el hipocampo una de las regiones cerebrales que presenta mayor susceptibilidad a presentar el llamado foco epiléptico. La esclerosis hipocampal, caracterizada por atrofia, disminución neuronal y gliosis, es una alteración frecuente, aunque no siempre observada, en pacientes con ELT (7). Además, evidencia indirecta como lo es la determinación sérica de enolasa y estudios de neuroimagen apoyan la premisa de que las crisis epilépticas (convulsivas) causan muerte neuronal (7, 46, 56, 72). Sin embargo, aún hasta la fecha permanece el debate respecto a si las crisis epilépticas aisladas causan muerte neuronal (57). Por el contrario, la evidencia apoya que el *status epilepticus*, actividad epiléptica continua y prolongada, causa muerte neuronal en el hipocampo y regiones extrahipocampales como la amígdala y la corteza cerebral (16) y se considera un factor predisponente para el desarrollo de epilepsia (23). Es precisamente por esta controversia, que la epilepsia no ha sido incluida dentro de las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, a continuación se presenta una serie de hallazgos obtenidos a partir de experimentos realizados tanto en tejido humano como en animales de experimentación que sugieren mecanismos celulares implicados en los procesos de muerte neuronal en el hipocampo asociados con la actividad epiléptica convulsiva.

Al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas, un aumento anormal de la actividad glutamatérgica (hipótesis glutamatérgica) se propone como la responsable de la patofisiología de la epilepsia, debido a su efecto excitotóxico sobre las neuronas (15). A partir de estudios de inmunomarcaje realizados en muestras de hipocampo obtenidas tras su recesión quirúrgica durante cirugía de epilepsia, se han identificado las formas activas de las caspasa-3 y -1 (21, 22, 64, 84) y niveles nucleares altos de la ADNasa activada por caspasas (59). De manera similar, se ha reportado la activación de las caspasas -6, -7, -8 y -9 en la fracción microsomal que contiene retículo endoplásmico a partir de tejido epiléptico (85). Así mismo, existe un aumento citoplasmático del receptor tipo 1 del factor de necrosis tumoral tipo alfa capaz de iniciar la vía de muerte celular dependiente de caspasa-8 (85). También se han identificado marcadores de muerte celular no relacionados con caspasas en muestras de pacientes con ELT, tal es el caso del factor inductor de

CONSIDERACIONES TERAPÉUTICAS

Los abordajes terapéuticos realizados a la fecha se fundamentan en gran medida en los mecanismos de muerte neuronal revisados previamente, aunque aún son escasos, controversiales, en muchos casos limitados a la práctica experimental debido a limitaciones tecnológicas, e incluso algunos con resultados desalentadores. Lo anterior, aunado a la incertidumbre sobre en qué momento del proceso neurodegenerativo a lo largo de la vida del sujeto se debe o puede realizar el tratamiento neuroprotector, limita el desarrollo de nuevas terapias. Así, en la búsqueda de tratamientos orientados a contrarrestar la neurodegeneración se han empleado: **1)** antagonistas del receptor glutamatérgico NMDA, principalmente la memantina (39, 74); **2)** antioxidantes, como la coenzima Q y la vitamina E (4, 70, 27); **3)** quelantes de radicales libres, como la cistamina (69); **4)** inhibidores de caspasas o citocromo c (35, 70, 82), de la agregación del β A (12), y de la enzima Kinurenina 3-monooxigenasa (60).

Al recapitular, esta breve revisión deja claro que aún hay más preguntas que respuestas respecto a cómo y por qué las neuronas mueren en estas enfermedades y abre un abanico de posibilidades para la búsqueda de terapias que la contrarresten.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la Beca de Investigación Básica a MLLM (106402).

REFERENCIAS

1. Adamczyk A, Kaźmierczak A, Czapski GA, Strosznajder JB. alpha-Synuclein induced cell death in mouse hippocampal (HT22) cells is mediated by nitric oxide-dependent activation of caspase-3. *FEBS Lett.* 2010 en prensa.
2. Alberdi E, Sánchez-Gómez MV, Cavaliere F, Pérez-Samartín A, Zugaza JL, Trullas R, Domercq M, Matute C. Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium.* 2010; 47(3):264-72.
3. Auer RN. Excitotoxic mechanisms, and age related susceptibility to brain damage in ischemia, hypoglycemia and toxic mussel poisoning. *Neurotoxicology.* 1991; 12(3): 541-6.
4. Beal MF. Therapeutic approaches to mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009; 15 Suppl 3:S189-94.
5. Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci.* 1991; 11:1649-59.
6. Boll MC, Segovia J. Enfermedad de Huntington. En: *Neurobiología de los trastornos neuropsiquiátricos mas prevalentes en México.* Editor Mena, R. 2009. Cd. de México, México. pp 193-206.
7. Briellmann RS, Newton MR, Wellard M, Jackson GD. Hippocampal sclerosis following brief generalized seizures in adulthood. *Neurology.* 2001; 57:315-17.

8. Butterfield DA. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.* 2001; 7: 548-54.
9. Cavazos JE, Das I, Sutula TP. Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci.* 1994;14:3106-21.
10. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2000; 71(2): 621S-629S.
11. Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2005; 74: 29-52
12. Creed MC, Milgram NW. Amyloid-modifying therapies for Alzheimer's disease: therapeutic progress and its implications. *Age (Dordr).* 2010 en prensa.
13. De Iuliis A, Burlina AP, Boschetto R, Zambenedetti P, Arslan P, Galzigna L. Increased dopamine peroxidation in postmortem Parkinsonian brain. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1573(1):63-7.
14. Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2009; 30(4):379-87.
15. Eid T, Williamson A, Lee TS, Petroff OA, de Lanerolle NC. Glutamate and astrocytes-key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia.* 2008; 49 Suppl 2:42-52.
16. Fujikawa DG, Itabashi HH, Wu A, Shinmei SS. Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy. *Epilepsia.* 2000; 41(8): 981-91.
17. Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci.* 2008; 27(11):2803-20.
18. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1984; 120 (3):885-90.
19. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(13): 4913-17.
20. Henshall DC, Bonislawski DP, Skradski SL, Lan JQ, Meller R, Simon RP. Cleavage of bcl-2 may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures. *Neurobiol Dis.* 2001; 8(4):568-80.
21. Henshall DC, Clark RS, Adelson PD, Chen M, Watkins SC, Simon RP. Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 2000; 55:250-257.
22. Henshall DC, Schindler CK, So NK, Lan JQ, Meller R, Simon RP. Death-associated protein kinase expression in human temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology.* 2004; 55:485-494.
23. Hesdorffer DC, Logroscino G, Cascino G, Annegers JF, Hauser WA. Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. *Ann Neurol.* 1998; 44(6):908-12.
24. Hobbs NZ, Barnes J, Frost C, Henley SM, Wild EJ, Macdonald K, Barker RA, Scahill RI, Fox NC, Tabrizi SJ. Onset and progression of pathologic atrophy in Huntington disease: a longitudinal MR imaging study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010; 31(6):1036-41.
25. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT. The carboxy terminus of the β -amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implication for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 1993; 32(18):4693-7.
26. Jonson G, Sachs CH. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neuron. *Eur J Pharmacol.* 1970; 9:141-55.
27. Kamat CD, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN, Hensley K. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis.* 2008; 15(3):473-93.
28. Klepac N, Relja M, Klepac R, Hećimović S, Babić T, Trkulja V. Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects : a cross-sectional study. *J Neurol.* 2007; 254(12):1676-83.
29. Kopin IJ. Toxins and Parkinson's disease: MPTP parkinsonism in humans and animal. *Avd Neurol.* 1986; 45:137-44.
30. Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacol Rep.* 2010; 62(1):1-14.
31. Lakis J, Glasco S, Miller SW, Thal LJ, Davis RE. Production of reactive oxygen species correlates with decreased cytochrome oxidase activity in Alzheimer's disease cybrids. *Soc Neurosci.* 1995;21:979.
32. Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA and Price DL. Human α -synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 Thr mutation

- causes neurodegenerative disease with α -synuclein aggregation in transgenic mice. *PNAS*. 2002; 13(99):8971.
33. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England Journal of Medicine*. 1994; 330(9): 613-22.
 34. Liu H, Cao Y, Basbaum AI, Mazarati AM, Sankar R, Wasterlain CG. Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(21):12096-101.
 35. Lopez-Meraz ML, Wasterlain CG, Rocha LL, Allen S, Niquet J. Vulnerability of postnatal hippocampal neurons to seizures varies regionally with their maturational stage. *Neurobiol Dis*. 2010; 37(2):394-402.
 36. Luquin, MR. Modelos experimentales de enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol*. 2000; 31(1):60-66.
 37. Mandemakers W, Morais VA, De Strooper B. A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *Journal of Cell Science*. 2007; 120(Pt 10):1707-16
 38. Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem*. 2002; 277:1641-44.
 39. Martinez-Coria H, Green KN, Billings LM, Kitazawa M, Albrecht M, Rammes G, Parsons CG, Gupta S, Banerjee P, LaFerla FM. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am J Pathol*. 2010; 176(2):870-80.
 40. Martínez-Rojas D, Feria-Velasco A. Procesos moleculares comunes, alterados en los padecimientos neurodegenerativos. En: *Neurobiología de los trastornos neuropsiquiátricos mas prevalentes en México*. Editor Mena, R. 2009. Cd. de México, México. pp 1-11.
 41. Meredith GE, Totterdell S, Beales M, Meshul CK. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2009; 219(1):334-40.
 42. Moráles I, Fuentes A, Gonzalez-Hernandez T, Rodríguez M. Osmosensitive response of glutamate in the substantia nigra. *Experimental Neurology* 220. 2009; 335-40.
 43. Niquet J, Auvin S, Archie M, Seo DW, Allen S, Sankar R, Wasterlain CG. Status epilepticus triggers caspase-3 activation and necrosis in the immature rat brain. *Epilepsia*. 2007; 48(6):1203-6.
 44. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2001; 60(8): 759-67.
 45. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 2000; 23: S8-S19.
 46. Palmio J, Keränen T, Alapirtti T, Hulkkonen J, Mäkinen R, Holm P, Suhonen J, Peltola J. Elevated serum neuron-specific enolase in patients with temporal lobe epilepsy: a video-EEG study. *Epilepsy Res*. 2008;81: 155-60.
 47. Paola D, Domenicotti C, Nitti M, Vitali A, Borghi R, Cottalasso D, Zaccheo D, Odetti P, Strocchi P, Marinari UM, Tabaton M, Pronzato MA. Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid beta-protein production and selective activation of betaI and betaII PKCs in NT2 cells. *Biochemical and biophysical research Communications*. 2000; 268(2):642-6.
 48. Parihar MS, Hemnani T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci*. 2004;11(5):456-67.
 49. Paris I, Cardenas S, Perez-Pastene C, Lozano J, Graumann R, Riveros A, Caviedes P, Segura-Aguilar J. Aminochrome as preclinical model to study degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's Disease. *Neurotox Res*. 2007; 12:125-134.
 50. Paris I, Lozano J, Perez-Pastene C, Muñoz P, Segura-Aguilar J. Molecular and neurochemical mechanisms in PD pathogenesis. *Neurotox Res*. 2009;16(3):271-9.
 51. Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos ON, Pérez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Chaverri J, Santamaría A. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinate iron (III). *Neuroscience*. 2005; 135(2):463-74.
 52. Pérez-Severiano F, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Ríos C, Segovia J. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity,

- in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Neurochem Res.* 2004; 29(4):729-33.
53. Pérez-Tur J. Genetics and Alzheimer's disease. *Rev Neurol.* 2000; 30(2):161-9.
54. Pirkevi C, Lesage S, Brice A, Başak AN. From genes to proteins in mendelian Parkinson's disease: an overview. *Anat Rec (Hoboken).* 2009; 292(12):1893-901.
55. Pollard H, Charriaut-Marlangue C, Cantagrel S, Represa A, Robain O, Moreau J, Ben-Ari Y. Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience.* 1994; 63(1):7-18.
56. Rabinowicz AL, Correale J, Boutros RB, Couldwell WT, Henderson CW, DeGiorgio CM. Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring. *Epilepsia.* 1996; 37:122-125.
57. Rocha LL, López-Meraz ML, Niquet J, Wasterlain CG. Do Single Seizures Cause Neuronal Death in the Human Hippocampus? *Epilepsy Currents.* 2007; 7(3):77-81.
58. Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, Pereira de Vasconcelos A, Wasterlain CG. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci.* 1998; 18(20):8382-93.
59. Schindler CK, Pearson EG, Bonner HP, So NK, Simon RP, Prehn JH, Henshall DC. Caspase-3 cleavage and nuclear localization of caspase-activated DNase in human temporal lobe epilepsy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2006; 26:583-589.
60. Schwarcz R, Guidetti P, Sathyasaikumar KV, Muchowski PJ. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 2010; 90(2):230-45.
61. Segovia J, Pérez-Severiano F. Oxidative damage in Huntington's disease. *Methods Mol Biol.* 2004; 277:321-34.
62. Segura-Aguilar J, Metodiewa D, Welch C. Metabolic activation of dopamine o-quinones to o-semiquinones by NADPH cytochrome P450 reductase may play an important role in oxidative stress and apoptotic effects. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1381:1-6
63. Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp. Neurol.* 2003; 179 (1): 9-16.
64. Shinoda S, Schindler CK, Meller R, So NK, Araki T, Yamamoto A, Lan JQ, Taki W, Simon RP, Henshall DC. Bim regulation may determine hippocampal vulnerability after injurious seizures and in temporal lobe epilepsy. *The Journal of Clinical Investigation.* 2004; 113:1059-1068.
65. Simonian, NA, Hyman BT. Functional alterations in Alzheimer's disease: diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1993; 52:580-5.
66. Singh S, Kumar S, Dikshit M. Involvement of the mitochondrial apoptotic pathway and nitric oxide synthase in dopaminergic neuronal death induced by 6-hydroxydopamine and lipopolysaccharide. *Redox Rep.* 2010; 15(3):115-22.
67. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000; 1502(1): 139-44.
68. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95 (11): 6469-73.
69. Stack EC, Ferro JL, Kim J, Del Signore SJ, Goodrich S, Matson S, Hunt BB, Cormier K, Smith K, Matson WR, Ryu H, Ferrante RJ. Therapeutic attenuation of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurotoxin models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1782(3):151-62.
70. Stack EC, Smith KM, Ryu H, Cormier K, Chen M, Hagerty SW, Del Signore SJ, Cudkowicz ME, Friedlander RM, Ferrante RJ. Combination therapy using minocycline and coenzyme Q10 in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762(3):373-80.
71. Tamagno E, Guglielmotto M, Aragno M, Borghi R, Autelli R, Giliberto L, Muraca G, Danni O, Zhu X, Smith MA, Perry G, Jo DG, Mattson MP, Tabaton M. Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *Journal of neurochemistry.* 2008; 104(3):683-95.
72. Tasch E, Cendes F, Li LM, Dubeau F, Andermann F, Arnold DL. Neuroimaging evidence of progressive neuronal loss and dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology.* 1999; 45:568-576.

73. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993; 72(6):971-83.
74. Thomas SJ, Grossberg GT. Memantine: a review of studies into its safety and efficacy in treating Alzheimer's disease and other dementias. *Clin Interv Aging*. 2009; 4:367-77.
75. Turmel H, Hartmann A, Parain K, Douhou A, Srinivasan A, Agid Y, Hirsch EC. Caspase-3 activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Mov Disord*. 2001; 16:185-9.
76. Uysal H, Cevik IU, Soylemezoglu F, Elibol B, Ozdemir YG, Evrenkaya T, Saygi S, Dalkara T. Is the cell death in mesial temporal sclerosis apoptotic? *Epilepsia*, 2003; 44:778-784.
77. Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci*. 2003; 4, 365-75.
78. Vis JC, Schipper E, de Boer-van Huizen RT, Verbeek MM, de Waal RM, Wesseling P, ten Donkelaar HJ, Kremer B. Expression pattern of apoptosis-related markers in Huntington's disease. *Acta Neuropathol*. 2005; 109(3):321-8.
79. Viswanath V, WuY, Boonplueang R, Chen S, Stevenson FF, Yantiri F, Yang L, Beal MF, Andersen JK. Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2000; 21:9519-9528.
80. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, Magrané J, Moore DJ, Dawson VL, Grailhe R, Dawson TM, Li C, Tieu K, Przedborski S. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(1):378-83.
81. Wallace BA, Ashkan K, Heise CE, Foote KD, Torres N, Mitrofanis J, Benabid AL. Survival of midbrain dopaminergic cells after lesion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Brain*. 2007; 130(Pt 8):2129-45.
82. Wang X, Zhu S, Pei Z, Drozda M, Stavrovskaya IG, Del Signore SJ, Cormier K, Shimony EM, Wang H, Ferrante RJ, Kristal BS, Friedlander RM. Inhibitors of cytochrome c release with therapeutic potential for Huntington's disease. *J Neurosci*. 2008; 28(38):9473-85.
83. Winklhofer KF, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802(1):29-44.
84. Yamamoto A, Murphy N, Schindler CK, So NK, Stohr S, Taki W, Prehn JH, Henshall DC. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis signaling in human temporal lobe epilepsy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2006a; 65:217-25.
85. Yamamoto A, Schindler CK, Murphy BM, Bellver-Estelles C, So NK, Taki W, Meller R, Simon RP, Henshall DC. Evidence of tumor necrosis factor receptor 1 signaling in human temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*, 2006b; 202:410-20.
86. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(34):14670-5.
87. Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science*. 1988; 241 (4868): 981-3.
88. Zhang Y, Ona VO, Li M, Drozda M, Dubois-Dauphin M, Przedborski S, Ferrante RJ, Friedlander RM. Sequential activation of individual caspases, and of alterations in Bcl-2 proapoptotic signals in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem*. 2003; 87(5):1184-92.
89. Zhao S, Aviles ER Jr, Fujikawa DG. Nuclear translocation of mitochondrial cytochrome c, lysosomal cathepsins B and D, and three other death-promoting proteins within the first 60 minutes of generalized seizures. *J Neurosci Res*. 2010; 88(8):1727-37.

3

APOPTOSIS NEURONAL: PAPEL DE LA GSK3 β Y DE LA CDK5

¹Pizarro JG, ¹Yeste-Velasco M, ¹Alvira D, ¹Rimbau V, ²Folch J, ³Sureda FX, ¹Camins A, ⁴Beas-Zárate C.

¹Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

²Unitat de Bioquímica y ³Unitat de Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, CIBERNED, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.

⁴Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.

INTRODUCCIÓN

La muerte celular es un fenómeno muy importante en el desarrollo del SNC (Sistema Nervioso Central) y también, es la principal causa de muchas enfermedades neurodegenerativas.

El Comité para la nomenclatura de la muerte celular (NCCD; *Nomenclature Committee on Cell Death*), constituido por un selecto grupo de expertos en el año 2005 [Kroemer et al., 2005], sentó las bases para poder definir, a partir de qué momento puede considerarse que una célula, está muerta. Las células que están muriendo pueden revertir el proceso hasta que superan un “punto de no retorno”. Aunque no existe una definición bioquímica clara, se ha propuesto que este punto, se supera cuando se produce una activación masiva de caspasas, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la completa permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la exposición de residuos fosfatidilserina a la superficie celular. El NCCD ha propuesto que una célula debe considerarse muerta cuando se encuentran algunos de los siguientes criterios morfológicos o moleculares: (a) que la célula haya perdido la integridad de la membrana plasmática; (b) que la célula, incluido el núcleo, sufra una completa fragmentación en cuerpos discretos (“cuerpos

apoptóticos”); y (c) que estos “cuerpos apoptóticos” hayan sido fagocitados *in vivo* por células adyacentes [Kroemer et al., 2005].

TIPOS DE MUERTE CELULAR

La muerte celular puede clasificarse en base a diferentes criterios, entre los cuales podemos encontrar la clasificación según las características morfológicas de la célula durante el proceso de muerte (divide la muerte celular en apoptosis, autofagia y en necrosis); teniendo en cuenta aspectos funcionales (muerte celular programada o accidental, fisiológica o patológica); de acuerdo a criterios enzimáticos (con o sin de nucleasas o distintas clases de proteasas, como caspasas, calpaínas o catepsinas); o por características inmunológicas (immunogénica o no-immunogénica) [Galluzzi et al., 2007].

El NCCD también decidió que la clasificación “oficial” de las modalidades de muerte celular debía depender de las características morfológicas de la célula que se observaban en el proceso de muerte, dividiéndola en apoptosis, autofagia y necrosis.

Apoptosis

La apoptosis, o Muerte Celular Programada (MCP), se trata de un proceso controlado, activo y bien definido, donde la célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos, como una retracción celular y una condensación y fragmentación de la cromatina, que van acompañados por modificaciones bioquímicas características como: aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular; una reducción del potencial de membrana mitocondrial; generación de radicales libres; y externalización de residuos fosfatidilserina a la superficie celular [Kerr et al., 1972].

Al final del proceso de apoptosis, las protuberancias superficiales se separan de la célula arrastrando parte del citoplasma y de los orgánulos intracelulares, formando unas estructuras esféricas, llamadas cuerpos apoptóticos, que pueden llevar algún fragmento nuclear. Estos cuerpos aparecen dispersos por el tejido y normalmente son liberados a los lúmenes más cercanos o fagocitados por macrófagos.

La apoptosis se caracteriza por ser dependiente de unas proteasas llamadas caspasas. Las caspasas iniciadoras pueden activarse por una vía extrínseca (mediada

por receptores de muerte) o por una vía intrínseca (o vía mitocondrial, mediada por la liberación de citocromo c, donde participan las proteínas de la familia Bcl-2). Las dos vías convergen y activan a las caspasas ejecutoras, las cuales se asocian a la activación de la CAD (Caspase-Activated-DNase) que degradará el DNA internucleosomal en fragmentos de 180-200 pb [Hengartner, 2000].

Necrosis

Se desarrolla en condiciones patológicas, cuando la célula es sometida a una lesión que causa un daño intenso en las membranas celulares. Esto altera la capacidad para mantener la homeostasis, entra agua e iones extracelulares al interior de la célula aumentando el volumen. Se produce una inflamación mitocondrial y nuclear, y una disolución de orgánulos intracelulares. En la fase final de la necrosis se produce la rotura de las membranas citoplasmáticas y nucleares, con la consecuente degradación del DNA. Este proceso libera enzimas lisosomales y otras sustancias que dañarán el tejido circundante generando una respuesta inflamatoria [Friedlander, 2003].

La necrosis se caracteriza por ser un proceso rápido, pasivo (sin gasto de energía), masivo, incontrolado y difícil de prevenir o tratar.

MITOCONDRIA Y MUERTE CELULAR

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático que controla diferentes funciones básicas de la célula como la producción de energía en forma de ATP, el control de los radicales libres y la regulación de los niveles de calcio intracelular [Kwong et al., 2006]. La mitocondria es un punto de convergencia de diferentes vías intracelulares de señalización de muerte. Este orgánulo constituye un reservorio de proteínas proapoptóticas como son el citocromo c, Smac/Diablo, HtrA2/Omi, AIF y Endo G (endonucleasa G). Así pues, la desregulación de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial permitirá la liberación de estas proteínas desde el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma, donde desencadenarán la muerte celular, a través de vías dependientes o independientes de caspasas [Parone et al., 2002].

Mecanismo de permeabilización mitocondrial

Existen dos mecanismos distintos que permiten la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial: la rotura inespecífica de la membrana externa mitocondrial y la formación de canales conductores. La permeabilización de la mitocondria es controlada por miembros de la familia Bcl-2 [Galluzzi et al., 2009].

Rotura de la membrana externa mitocondrial

Este mecanismo es regulado por el complejo de poro de permeabilidad transitoria (PTPC, Permeability Transition Pore Complex), un gran canal no selectivo, que se puede formar por la superposición de proteínas transmembranales de las membranas mitocondriales interna y externa en los lugares de contacto entre ellas. El PTPC se conforma por tres proteínas transmembranales: el VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), que se encuentra en la membrana externa, el ANT (Adenine-Nucleotide Translocator), que se encuentra en la membrana interna, y el BPR (Benzodiazepine Peripheral Receptor), a las que se une una proteína citosólica, la HK (HexoKinase), una proteína del espacio intermembrana, la CK (Creatine Kinase), y una proteína de la matriz, la Cph D (Cyclophilin D).

En condiciones fisiológicas, el PTPC presenta una conformación de conductancia reducida, que permite el intercambio de metabolitos entre la matriz mitocondrial y el citosol. En respuesta a diferentes estímulos (calcio, especies reactivas de oxígeno, baja concentración de nucleótidos de adenina, fosfatos inorgánicos, cambios en el pH y un potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\psi_m$) bajo), el PTPC asume una conformación de conductancia elevada que permite una entrada desregulada de solutos y agua a la matriz mitocondrial, con la consecuente disipación del $\Delta\psi_m$, que provoca un aumento de tamaño de la mitocondria. Este cambio morfológico tiene como consecuencia una expansión de la membrana interna mitocondrial que acaba rompiendo la membrana externa y, por tanto, se libera todo el contenido mitocondrial, incluyendo lo del espacio intermembrana al citosol [Crompton, 1999]. Los miembros de la familia Bcl-2 pueden regular la obertura del PTPC: los miembros pro-apoptóticos la promueven, mientras que los miembros anti-apoptóticos la previenen.

Formación de canales conductores

Los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax y Bak, a través de su oligomerización en la membrana externa mitocondrial, forman canales suficientemente grandes para permitir el paso de proteínas solubles, sin dañar la mitocondria [Antonsson et al., 2000]. Este mecanismo se ha llamado MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*); y se ha sugerido que a través de estos canales puedan pasar proteínas en ambas direcciones, tanto del espacio intermembrana al citosol como a la inversa. Por ejemplo, proteasas como calpaínas y caspasas podrían acceder al espacio intermembrana [Ricci et al., 2004].

PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Bcl-2 Y APOPTOSIS

Las proteínas de la familia Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma-2*) participan en el control de la MCP al regular la permeabilización mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas [Gross et al., 1999]. Esta familia, incluye miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos, que característicamente presentan uno o más dominios de homología Bcl-2 (dominios BH). En este sentido, se han descrito 4 dominios BH: BH1-4, que según la presencia o ausencia de estos dominios, las proteínas de la familia Bcl-2 se clasifican en 3 subgrupos [Adams y Cory, 1998]:

Proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas

Tienen los 4 dominios BH. Los miembros más importantes son Bcl-2 y Bcl-XL (Bcl-2-like 1) y son proteínas que se encuentran en la membrana externa mitocondrial. Tienen actividad anti-apoptótica ya que secuestran en complejos inactivos a los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 [Antonsson et al., 1997].

Proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas multidominio

Tienen los dominios BH1-3. Los miembros más importantes son la proteína citosólica: Bax (*Bcl-2-Associated protein X*) y la proteína de membrana mitocondrial externa: Bak (*Bcl-2-Antagonist/Killer*). Frente a estímulos apoptóticos, Bax y Bak experimentan modificaciones estructurales que producen su oligomerización, imprescindible para la inserción en la membrana mitocondrial externa y formación de canales que permitan la liberación de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana al citosol [Antonsson et al., 2000; Wei et al., 2000].

Proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas BH3

Sólo tienen el dominio BH3. Pueden dividirse en dos grupos: activadores y facilitadores. Los activadores, como Bid (*BH3-interacting-domain death agonist*), interactúan directamente con Bax y Bak, activándolas. Los facilitadores, como Bad (*Bcl-2-associated death promoter*), Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*), Noxa y Puma (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) entre otros, se unen a los miembros anti-apoptóticos, como Bcl-2, desplazándolos de sus interacciones inhibitoras que ejercen sobre Bax y Bak.

La regulación de las proteínas de la familia Bcl-2 incluye tanto el control a nivel transcripcional y post-traducciona, como la translocación de proteínas y las interacciones proteína-proteína.

PROTEÍNAS MITOCONDRIALES IMPLICADAS EN LA MUERTE CELULAR

Citocromo c

El citocromo c es un componente esencial de la cadena transportadora de electrones mitocondrial que participa en la transferencia de electrones entre el complejo III (complejo citocromo c reductasa) y el complejo IV (complejo citocromo c oxidasa). Después de ser liberado al citosol, el citocromo c se une a Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor-1*) induciendo un cambio conformacional que hará que se unan las procaspasas 9 para formar el apoptosoma, activando la vía de las caspasas [Jiang y Wang, 2000].

Smac/Diablo

La proteína Smac/Diablo (*Second Mitochondrial-derived Activator of Caspases/Direct Inhibitor of Apoptotic Protein*) también se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria y una vez liberado al citosol interacciona con las IAPs (*Inhibitor of Apoptotic Proteins*) suprimiendo el efecto inhibitor que éstas ejercen sobre caspasas iniciadoras (como la caspasa 9) y efectoras (como la caspasa 3) [Du et al., 2000].

HtrA2/Omi

HtrA2/Omi es una proteína mitocondrial con actividad de proteasa de serinas que participa en la regulación de la muerte dependiente de caspasas, mediante su liberación al citosol y su unión a las IAPs. A diferencia de la Smac/Diablo, la HtrA2/Omi corta las IAPs inactivándolas [Yang et al., 2003]. También se ha

demostrado que puede inducir una muerte independiente de caspasas, a través de su actividad de proteasa, independientemente de su capacidad de unirse a las IAPs [Suzuki et al., 2001].

AIF

AIF es una flavoproteína mitocondrial de ~62 kDa localizada en la membrana mitocondrial interna, que presenta una actividad de NADH oxidasa con función local redox esencial en la fosforilación oxidativa y para una defensa antioxidante eficiente [Klein et al., 2002].

Algunos estímulos como el estrés oxidativo, el daño del DNA o el incremento de calcio intracelular, conducen a la salida de AIF de la mitocondria, a través de dos pasos: el primero, mediante una proteasa que separa AIF de la membrana mitocondrial interna liberándola al espacio intermembrana (generando un AIF soluble de ~57 kDa, también llamado AIF truncado o tAIF); y el segundo, liberando AIF al citosol a través de la membrana mitocondrial externa. Se ha demostrado que algunas isoformas de calpaínas (calpaína 1) y de catepsinas (B, L, S) pueden cortar a AIF provocando su liberación, mientras que las caspasas no pueden procesar proteolíticamente la AIF.

Una vez en el citosol, AIF se transloca al núcleo a través de un proceso activo. En el núcleo, AIF es capaz de unirse al DNA de manera independiente de la secuencia provocando la condensación de la cromatina.

PRINCIPALES PROTEASAS IMPLICADAS EN LA MUERTE CELULAR

Caspasas

Las caspasas son una familia de proteasas de cisteína que hidrolizan enlaces peptídicos en los que participan residuos de aspartato (*cysteine aspartyl-specific proteases*). Están involucradas en la iniciación y la ejecución de la apoptosis clásica, generando una cascada proteolítica que provocará la muerte celular.

Activación de las caspasas

Se sintetizan como proenzimas inactivas (procaspasas) que deben cortarse proteolíticamente para activarse. En todos los casos estudiados, la enzima madura es un heterotetrámero que contiene dos heterodímeros p20/p10 y dos centros activos.

Existen tres mecanismos generales de activación de caspasas [Hengartner, 2000]:

- Activación por otra caspasa: activación de una procaspasa por otra caspasa previamente activada.

- Activación inducida por proximidad: El reclutamiento de varias procaspasas permite que la baja e intrínseca actividad proteasa de las procaspasas sea suficiente para permitir que se corten mutuamente y se activen unas a otras.

- Activación por formación de holoenzima: El mecanismo de activación más complejo es el utilizado por la caspasa 9. Al contrario que en otras caspasas, el procesamiento proteolítico de la procaspasa 9 tiene un efecto mínimo en su activación. El requerimiento clave para la activación de la caspasa 9 es su asociación con un cofactor de proteínas, Apaf-1. También es necesario el citocromo c liberado por la mitocondria. El citocromo c y Apaf-1 se asocian en un proceso ATP dependiente. La oligomerización de Apaf-1 recluta procaspasas 9 formando el apoptosoma. La activación de la caspasa 9 es debida a un cambio conformacional, no a proteólisis.

Clasificación de las caspasas

1. Caspasas iniciadoras: incluye las caspasas 2, 8, 9, 10 y 12. Activan a las caspasas efectoras, iniciando así la cascada proteolítica. Se dividen en dos grupos según el tipo de dominio:

- dominio de reclutamiento de caspasas (CARD): caspasas 2, 9 y 12.

- dominio efector de la muerte (DED): caspasas 8 y 10.

2. Caspasas efectoras: incluye las caspasas 3, 6 y 7. Son las responsables de actuar sobre diferentes sustratos provocando la muerte celular.

3. Caspasas inflamatorias: incluye las caspasas 1, 4, 5, 11 y 13 que no están implicadas directamente con la apoptosis, sino que son activadoras de citoquinas teniendo un papel en la respuesta inflamatoria [Cohen, 1997].

Vías de activación de las caspasas

Vía extrínseca o de los receptores de muerte: se inicia por la activación de receptores de muerte celular como Fas y TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*), a través de la unión de sus ligandos (FasL y TNF), que inducen trimerización de los receptores, activándose para promover el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como la proteína FADD (*Fas-Associated with Death Domain*), que a través del

dominio efector de muerte (DED) se unen al dominio de muerte intracelular del receptor. Este complejo, llamado DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) induce el agrupamiento de la procaspasa 8 y la activa. En consecuencia, se activan otras caspasas, de forma directa (ejecutoras como caspasa 3) o de forma indirecta (mediante la rotura de Bid, que activa la vía mitocondrial) [Li et al., 2002].

Vía intrínseca o mitocondrial: se activa por estímulos pro-apoptóticos como el daño en el DNA, radiación UV, la suspensión de factores de crecimiento, o estrés oxidativo. Estos estímulos inducen la translocación de moléculas pro-apoptóticas a la mitocondria como Bax [Rich et al., 2000] y a consecuencia se liberan los factores apoptogénicos que contiene en el interior (como citocromo c, Smac/Diablo, HtrA2/Omi, AIF y Endo G). El citocromo c que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria se libera al citosol y se une a Apaf-1, en presencia de ATP, e induce un cambio conformacional en Apaf-1 que oligomeriza formando un heptámero y deja accesible su dominio de reclutamiento de caspasas (CARD). Esto provoca el reclutamiento de la procaspasa 9, se forma el apoptosoma. Se activa la caspasa 9 y una vez liberada activa directamente las caspasas ejecutoras como la caspasa 3 [Jiang y Wang, 2000].

Calpaínas

Las calpaínas son una familia de proteasas de cisteína localizadas en el citoplasma, que se activan por el calcio intracelular liberado principalmente por el retículo endoplasmático (calcium-activated (papain-like) neutral protease).

Existen tres tipos de calpaínas: las calpaínas típicas (1-3, 8a, 9 y 11-13), las calpaínas pequeñas (4 y 14) y las calpaínas atípicas (5, 6, 7, 8b, 10 y 15). Las calpaínas típicas contienen 4 dominios, con un dominio conservado similar al de las proteasas de cisteína y otro dominio similar al de la calmodulina. Las calpaínas pequeñas contienen 2 dominios, uno de los cuales es similar al de la calmodulina. Las calpaínas atípicas tienen reemplazados o eliminados algunos dominios, pero todas ellas carecen del dominio similar al de la calmodulina. Las calpaínas típicas 1, 2 y 9 forman un heterodímero con alguna calpaína pequeña, mientras que las otras calpaínas son monoméricas [Suzuki et al., 2004].

Mediante un proceso autocatalítico se transforman en la forma activa en respuesta al incremento de los niveles de calcio intracelular. Una vez activa trunca proteínas

como p35 (coactivador de CDK5) y proteoliza diferentes sustratos como a-espectrina y Tau (proteínas del citoesqueleto) que conducirán a la muerte celular [Lee et al., 2000; Evans y Turner, 2007].

Las calpaínas podrían ser capaces de conducir a la vía apoptótica intrínseca, porque se han relacionado con la rotura de proteínas reguladoras de la apoptosis como Bid, Bax y procaspasas 3 y 9, activándolas [Mandic et al., 2002]. Las calpaínas también pueden actuar sobre proteínas anti-apoptóticas como Bcl-XL, a la cual fragmenta convirtiéndola en una molécula pro-apoptótica [Nakagawa y Yuan, 2000]. Por otro lado, se ha observado que la caspasa 3 puede romper la calpastatina (inhibidor endógeno de la calpaína), permitiendo la activación de las calpaínas [Wang et al., 1998]. También se ha demostrado que la activación de calpaínas puede dar lugar a la liberación lisosomal de catepsinas [Yamashima et al., 1998] y que en algunos modelos son capaces de provocar la muerte de manera independiente de caspasas. Por lo tanto, las calpaínas además de provocar la muerte por ellas mismas también pueden regular e interactuar con otras vías.

PRINCIPALES CINASAS IMPLICADAS EN LA MUERTE CELULAR

CDK5

La CDK5 se expresa de forma ubicua, pero su actividad es específica de neuronas post-mitóticas del cerebro y es requerida para el correcto desarrollo del SNC. CDK5 participa en varias funciones neuronales incluyendo crecimiento de neuritas, migración axonal, laminación cortical, adhesión celular, transporte axonal y actividad sináptica [Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008].

A diferencia de las otras CDK's que regulan el ciclo celular, CDK5 no es activada por ciclinas, sino por dos proteínas de estructura similar llamadas p35 y p39, cuya expresión se restringe predominantemente a las neuronas [Tang et al., 1995], y que se localizan en la cara interna de la membrana plasmática [Lee et al., 2000]. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que p35 presenta una localización dinámica entre el núcleo y el citoplasma [Fu et al., 2006].

La actividad de CDK5 también puede ser regulada por fosforilación de residuos específicos, siendo fosforilada activamente en Ser159 por CAK (equivalente a la fosforilación de Thr160 en las CDKs), aunque esta fosforilación es dispensable

[Dhavan y Tsai, 2001]. Los residuos Thr14 y Tyr15 están conservados en la CDK5, pero no son fosforilados por Wee1/Myt1 [Poon et al., 1997]. El residuo Tyr15 de la CDK5 puede ser fosforilado por la cinasa c-Abl, resultando en una fosforilación activadora que incrementa la actividad cinasa de CDK5.

A modo de mecanismo de retroalimentación negativo, CDK5 puede fosforilar a p35 regulando su degradación por el proteasoma.

La secuencia consenso de fosforilación de CDK5 es (S/T)PX(K/R), donde S o T son las serina o treonina que pueden ser fosforiladas; P es la prolina obligatoria presente en la posición +1 (respecto a la serina o treonina fosforilada); X es cualquier aminoácido; y K o R son lisina o arginina, respectivamente, porque CDK5 muestra una marcada preferencia por residuos básicos en posición +3. CDK5 presenta una especificidad de sustrato idéntica a la de la CDK1 y CDK2, dada la similitud de estructura [Dhavan y Tsai, 2001].

Participación de la CDK5 en la supervivencia y la muerte neuronal

Las funciones fisiológicas relacionadas con la supervivencia celular de la CDK5 están mediadas por la fosforilación de varios sustratos que pertenecen a vías cruciales para la supervivencia o a través de la inactivación de vías apoptóticas. Por ejemplo, CDK5 inhibe vías apoptóticas como la JNK (*Jun N-terminal Kinase*) y activa vías de supervivencia como la de PI3K/Akt. Paralelamente, CDK5 puede inactivar a PP1 (*Protein Phosphatase 1*) que no es capaz de activar a GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) a través de la defosforilación del residuo Ser9, promoviendo la supervivencia. Además, la fosforilación de Bcl-2 por CDK5 contribuye a la supervivencia celular.

La inapropiada activación de CDK5 provoca la muerte neuronal. Varios autores han documentado la activación, mediada por Ca⁺⁺, de la proteasa calpaína y la rotura de los coactivadores p35 y p39 en p25 y p29, respectivamente, en modelos *in vitro* e *in vivo* de muerte neuronal [Nguyen et al., 2002]. A su vez, CDK5 fosforila el receptor NMDA (un receptor de glutamato que regula el flujo de calcio hacia el interior de la célula) y amplifica la entrada de Ca⁺⁺, activando las calpaínas e incrementando la rotura de p35 y su transformación en p25, en un modelo de isquemia en neuronas hipocampales. El complejo CDK5/p25 es más estable y produce una activación más prolongada de CDK5, así como una relocalización de CDK5 y una alteración de la

especificidad de sustrato. Por ejemplo, un sustrato de CDK5 es la proteína tau (proteína asociada a los microtúbulos), cuya fosforilación provoca agregados y una desestabilización del citoesqueleto que contribuyen a la muerte neuronal observada en la enfermedad de Alzheimer. Existen controversias sobre el papel de p25 en la enfermedad de Alzheimer, ya que algunos autores sugieren que la actividad de CDK5 incrementa independientemente de la acumulación de p25 siendo resultado de un incremento en los niveles de CDK5 y de modificaciones en la fosforilación activadora [Nguyen et al., 2002].

El tratamiento de cultivos primarios de neuronas corticales con diferentes estímulos apoptóticos, como el glutamato o el H₂O₂, provoca un incremento de la concentración de Ca⁺⁺, resultando en la activación de calpaínas y la consecuente rotura proteolítica de p35 en p25 [Lee et al., 2000].

Se ha demostrado que CDK5 puede fosforilar y activar a p53, un mediador de la vía apoptótica que incrementa la expresión de Bax [Zhang et al., 2008]. Paralelamente, CDK5 fosforila e inhibe a un factor de transcripción pro-supervivencia como MEF-2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) facilitando la muerte neuronal. Además, CDK5 puede unirse y desregular enzimas antioxidantes como la Prx-2 (peroxiredoxina-2).

Participación de la CDK5 en la enfermedad de Parkinson

Se ha documentado la acumulación de CDK5 y p35 en los cuerpos de Lewy y Girus Cinguli [Alvira et al. 2008] que se observan en las neuronas dopaminérgicas de muestras post-mortem de cerebros de pacientes con EP. También se ha observado un incremento en los niveles y en la actividad de CDK5 después de la administración de MPTP en ratones, así como las calpaínas se encuentran activadas y son requeridas para la muerte neuronal inducida por MPTP. El flavopiridol, un inhibidor farmacológico de CDKs, CDK5 entre ellas, protege a las neuronas dopaminérgicas de la degeneración inducida por MPTP *in vivo* [Smith et al., 2003].

Relación entre CDK5 y el ciclo celular

Inicialmente, se proponía que CDK5 no estaba implicada en procesos de regulación del ciclo celular como sugería la detección de CDK5 mayoritariamente en neuronas post-mitóticas. Pero, la supresión del gen de la CDK5 en ratones es letal y presenta defectos en la migración, diferenciación y supervivencia neuronal [Krantic et al., 2005], así como la presencia de marcadores de ciclo celular como ciclina D, ciclina A

y síntesis de DNA, sugiriendo que CDK5 es necesaria para bloquear el ciclo celular en una neurona normal del SNC.

Se han postulado dos mecanismos que permiten a CDK5 bloquear el ciclo celular en las neuronas. Por un lado, CDK5 podría unirse y estabilizar a p27Kip1 en el núcleo bloqueando el ciclo celular, mientras que cuando CDK5 y p27Kip1 se transportan fuera del núcleo se produce la transición G0-G1 [Lee et al., 2000]. Por otro lado, se ha observado que la CDK5 puede unirse a las ciclinas D y E, aunque no puede ser activada por ellas, pero bloquea que estas ciclinas se puedan unir a sus respectivas CDKs y se active el ciclo celular [Zhang y Herrup, 2008]. Paralelamente, CDK5 se puede unir a E2F y bloquear su actividad como factor de transcripción [Zhang y Herrup, 2008].

Por el contrario, el tratamiento con roscovitina previene la reentrada en ciclo de neuronas post-mitóticas en otros modelos como neuronas granulares de cerebelo tratadas con agentes que dañan el DNA [Tian et al., 2009]. La roscovitina es un derivado purínico que actúa como un potente inhibidor de CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 y CDK9, al competir con el ATP por su lugar de unión en las CDKs. Así, se ha documentado que roscovitina bloquea la proliferación de varios tumores celulares, incluyendo tipos neuronales. De hecho, roscovitina detiene la progresión del ciclo celular en las transiciones G1-S y G2-M, debido a la inhibición de la fosforilación de los sustratos de CDK1 y CDK2. Sin embargo, la inhibición de CDK7 y CDK9 bloquea la transcripción y contribuye a la parada del ciclo. Actualmente, la roscovitina se encuentra en ensayos clínicos de fase II como fármaco anti-tumoral [Benson et al., 2007].

Otro sustrato relacionado con el ciclo celular que puede ser fosforilado por CDK5 es la proteína pRb. En un modelo de muerte neuronal por inducción de p25, CDK5/p25 puede activar el ciclo celular porque fosforila directamente a pRb, puesto que ni el complejo CDK4-6/ciclina D ni CDK2/ciclina E son activados y la roscovitina bloquea esta fosforilación. Dado que la proteína pRb se asocia a proteínas como ciclina D a través de una secuencia consenso LXCXE, la unión de CDK5 podría estar mediada por la secuencia consenso parecida (LXCXXE) que se halla en p25 [Lee et al., 2000]. Este hecho explicaría la correlación entre la desregulación de CDK5 y la reentrada en ciclo celular observada en diferentes modelos de apoptosis neuronal.

GSK3

La proteína GSK (*Glycogen Synthase Kinase 3*) es una cinasa de serina y treonina ubicua, que inicialmente fue descrita como una enzima esencial involucrada en el metabolismo del glucógeno. Posteriormente se ha documentado que está implicada en un gran número de procesos que incluye el metabolismo del glucógeno, el mantenimiento y formación de la estructura celular, la expresión génica y la apoptosis. Existen dos isoformas de GSK3 en mamíferos, la GSK3 α y la GSK3 β , esta última es particularmente abundante en el SNC, siendo específica de neuronas [Yeste-Velasco et al., 2007].

La desregulación de esta cinasa se asocia con una gran variedad de enfermedades como las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer y la diabetes [Jope, 2003].

El mecanismo de regulación más conocido de GSK3 β es por fosforilación en el residuo Ser9, que inhibe su actividad. La vía PI3K/AKT es la principal cinasa que fosforila en Ser9 a GSK3 β . Los sustratos de GSK3 β , que han estado previamente fosforilados (“*priming phosphate*”), se unen a su lugar correspondiente (“*priming phosphate site*”), para poder ser fosforilados por GSK3 β . Cuando GSK3 β está fosforilada en Ser9, la parte N-terminal de la proteína se transforma en un pseudosustrato inhibitor que ocupa el “*priming phosphate site*” y también bloquea el sitio activo de esta cinasa. De manera contraria, la fosforilación en el residuo Tyr216 provoca la activación de GSK3 β , pero los mecanismos que regulan esta fosforilación no están bien definidos.

Otro mecanismo de regulación es la localización subcelular. GSK3 β es una proteína principalmente citoplasmática, pero también se puede encontrar en el núcleo y en la mitocondria, lo que determinará los sustratos que podrá fosforilar. Por otro lado, la acción de GSK3 β también está controlada por el estado de fosforilación de su sustrato, como ya se ha comentado anteriormente.

La GSK3 β regula la fosforilación de numerosas enzimas que participan en el metabolismo. Entre ellas, la glucógeno sintasa (GS, *Glycogen synthase*), el primer sustrato descrito de GSK3 β , que constituye el paso limitante de la vía de síntesis del glucógeno [Jope, 2003].

Otro grupo de sustratos son los factores de transcripción relacionados con la supervivencia y el crecimiento. Los efectos de la fosforilación inducida por GSK3 β

tienden a ser inhibidores e incluyen una disminución de afinidad por el DNA y la exportación del factor fuera del núcleo. Por ejemplo, fosforila a β -catenina, proteína implicada en la transcripción génica de genes que promueven la supervivencia celular, provocando su degradación. GSK3 β inhibe mediante fosforilación al factor HSF-1 (*Heat Shock Factor-1*), un factor de transcripción que induce la expresión de diferentes HSPs (*Heat Shock Proteins*) que protegen a la célula de diferentes agresiones. También puede regular a los factores de transcripción Myc y NF- κ B, que pueden promover o inhibir la apoptosis según las circunstancias (Mora et al. 2002). Además de regular la expresión génica, GSK3 β también puede regular la traducción mediante la fosforilación e inhibición de eIF2B (*Eukaryotic translation Initiation Factor 2B*), bloqueando la síntesis proteica, hecho que contribuye a inducir la apoptosis.

Muchas proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs, *Microtubule-Associated Proteins*), como la proteína Tau, son sustratos de GSK3 β , cuya fosforilación contribuye a desestabilizar el citoesqueleto [Joje, 2003]. GSK3 β también fosforilaría diferentes sustratos del ciclo celular como ciclina D y ciclina E, permitiendo su destrucción dependiente de ubiquitina [Yeste-Velasco, 2007]. Contrariamente, otros autores demuestran que GSK3 β no regula los niveles de ciclina D1 o que la actividad de GSK3 β induce un aumento de los niveles de ciclina D y E [Yeste-Velasco et al., 2007]. Los diferentes estudios muestran que los efectos de GSK3 β sobre el ciclo celular dependen tanto de la línea celular como del estímulo.

Una de las funciones más importantes de GSK3 β es la regulación de la apoptosis. Paradójicamente, GSK3 β puede promover la vía apoptótica intrínseca mitocondrial, pero también es capaz de inhibir la vía apoptótica extrínseca de los receptores de muerte. Está demostrado que la vía intrínseca mitocondrial puede ser amplificada por la GSK3 β , después de ser activada por diferentes estímulos, como por ejemplo la privación de factores tróficos, la inhibición de la vía PI3K/AKT, el daño del DNA, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad por glutamato o la hipoxia [Joje, 2003].

La GSK3 β contribuye a la disrupción de la membrana mitocondrial, debido a que puede activar directamente a Bax al fosforilarla en el residuo Ser163. También puede fosforilar a Mcl-1 (miembro anti-apoptótico de la familia Bcl-2) promoviendo su degradación. Además, GSK3 β puede fosforilar a la proteína VDAC, previniendo la

asociación de ésta con la hexoquinasa II y, por tanto, favoreciendo su unión a miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2. La actividad de GSK3 β también inhibe a CREB, inhibiendo de esta manera la expresión de Bcl-2. La GSK3 β puede inducir a Bax, a través de la activación de p53, mediante fosforilación directa en los residuos Ser33, Ser315 y Ser376 o por fosforilación e inhibición de la proteína MDM2.

La GSK3 β tiene un efecto anti-apoptótico en la apoptosis activada por la vía extrínseca. Se ha demostrado que el litio, un inhibidor de la GSK3 β , aumenta la citotoxicidad mediada por TNF en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente, se observó que los embriones de ratones *knockouts* para GSK3 β morían debido a una hipersensibilidad al TNF en el hígado. Se desconocen exactamente cuáles son los mecanismos implicados, pero sí que se conoce que GSK3 α actúa al principio de la vía, antes de la activación de la caspasa iniciadora 8.

El litio puede inhibir la GSK3 por dos mecanismos diferentes: directamente compitiendo con el Mg⁺⁺; e indirectamente inhibiendo la PP2A (Phosphatase 2A), que por lo tanto no inhibirá a AKT, permaneciendo activa y fosforilando inhibitoriamente a GSK3 α en Ser9 [Mora et al., 2002]. Su IC50 (*Inhibitory Concentration* 50) es 2mM. El litio es un catión monovalente que se administra en forma de cloruro de litio. Actualmente se utiliza como fármaco para el tratamiento de los trastornos bipolares y enfermedades maniaco-depresivas, donde presenta efectos anti-depresivos y anti-maniacos, pero también se ha determinado que tiene propiedades neuroprotectoras frente a diferentes estímulos perjudiciales en cultivos neuronales, así como en diferentes modelos animales de neurodegeneración [Yeste-Velasco et al., 2007]. El principal problema del litio, a la hora de estudiar los efectos de la GSK3, es su inespecificidad porque además de inhibir a GSK3 β , también puede activar a AKT, que tiene muchos sustratos, o inhibir otras cinasas como la MAPKAPK-2 o a las monofosfoesterasas.

Por otro lado, el SB-415286 es un derivado de las maleimidias, más concretamente una anilinomaleimida, que inhibe la GSK3 β al competir con el ATP por su lugar de unión. Es un inhibidor muy potente, con una IC50 de 130 nM, y bastante específico [Jope, 2003], que podría utilizarse para disminuir la muerte por apoptosis asociada a GSK3 β .

REFERENCIAS

1. Adams,J.M. & Cory,S. The Bcl2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326 (1998).
2. Alvira D, et al. Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the girus cinguli in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008;14(4):309-13
3. Antonsson,B. et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372 (1997).
4. Antonsson,B., Montessuit,S., Lauper,S., Eskes,R., & Martinou,J.C. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 271-278 (2000).
5. Cheung,Z.H., Gong,K., & Ip,N.Y. Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2. *J. Neurosci.* 28, 4872-4877 (2008).
6. Crompton,M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341, 233-249 (1999).
7. Cohen,G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16 (1997).
8. Dhavan,R. & Tsai,L.H. A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 749-759 (2001).
9. Du,C., Fang,M., Li,Y., Li,L., & Wang,X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42 (2000).
10. Dhariwala,F.A. & Rajadhyaksha M.S. An unusual member of the Cdk family: Cdk5. *Cell Mol Neurobiol.* 28, 351-369 (2008).
11. Evans,J.S. & Turner,M.D. Emerging functions of the calpain superfamily of cysteine proteases in neuroendocrine secretory pathways. *J. Neurochem.* 103, 849-859 (2007).
12. Friedlander,R.M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 1365-1375 (2003).
13. Fu,X. et al. Identification of nuclear import mechanisms for the neuronal Cdk5 activator. *J. Biol. Chem.*281, 39014-39021 (2006).
14. Galluzzi,L., Blomgren,K., & Kroemer,G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 481-494 (2009).
15. Gross,A., McDonnell,J.M., & Korsmeyer,S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911 (1999).
16. Hengartner,M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776 (2000).
17. Jiang,X. & Wang,X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 275, 31199-31203 (2000).
18. Jope RS. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci.* 24, 441-443. (2003)
19. Kerr,J.F., Wyllie,A.H., & Currie,A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257 (1972).
20. Klein,J.A. & Ackerman,S.L. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J. Clin. Invest* 111, 785-793 (2003).
21. Krantic,S., Mechawar,N., Reix,S., & Quirion,R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 670-676 (2005).
22. Kroemer,G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death. Differ.* 12 Suppl 2, 1463-1467 (2005).
23. Kroemer,G., Galluzzi,L. & Brenner,C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 87, 99-163 (2007).
24. Kwong,J.Q., Beal,M.F., & Manfredi,G. The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 97, 1659-1675 (2006).
25. Lee,M.S. et al. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360-364 (2000).
26. Li,S. et al. Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 26912-26920 (2002).
27. Mandic,A. et al. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 22, 3003-3013 (2002).
28. Mora,A. et al. Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Cell Signal.* 14, 557-562 (2002).
29. Nakagawa,T. & Yuan,J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* 150, 887-894 (2000).

31. Nguyen,M.D., Mushynski,W.E., & Julien,J.P. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death. Differ.* 9, 1294-1306 (2002).
32. Parone,P.A., James,D., & Martinou,J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84, 105-111 (2002).
33. Poon,R.Y. & Hunter,T. Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* 270, 90-93 (1995).
34. Ricci,J.E. et al. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117, 773-786 (2004).
35. Rich,T., Allen,R.L., & Wyllie,A.H. Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783 (2000).
36. Suzuki,Y. et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* 8, 613-621 (2001).
37. Smith PD, Crocker SJ, Jackson-Lewis V,et al. Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 11;100:13650-13655
38. Suzuki,K., Hata,S., Kawabata,Y., & Sorimachi,H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 53 Suppl 1, S12-S18 (2004).
39. Tang,D. et al. An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J. Biol. Chem.* 270, 26897-26903 (1995).
40. Tian,B., Yang,Q., & Mao,Z. Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death. *Nat. Cell Biol.* 11, 211-218 (2009).
41. Wei,M.C. et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 14, 2060-2071 (2000).
42. Wang,K.K. et al. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 187-196 (1998).
43. Yang,Q.H., Church-Hajduk,R., Ren,J., Newton,M.L., & Du,C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev.* 17, 1487-1496 (2003).
44. Yeste-Velasco,M. et al. Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 53, 295-307 (2007).
45. Yamashima,T. et al. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur. J.Neurosci.* 10, 1723-1733 (1998).
46. Zhang,J. & Herrup,K. Cdk5 and the non-catalytic arrest of the neuronal cell cycle. *Cell Cycle* 7, 3487-3490 (2008).

4

EFECTORES INTRACELULARES ASOCIADOS A LA SEÑALIZACIÓN EN LA EXCITOTOXICIDAD

¹Rivera-Cervantes MC, ¹Castañeda-Arellano R, ²Camins A, ¹Feria-Velasco AI, ¹Beas-Zárate C.

¹Instituto de Neurobiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

²Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB) Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Universitat de Barcelona. Barcelona, España.

MECANISMOS DE DAÑO CELULAR POR EXCITOTOXICIDAD

El glutamato (Glu) como neurotransmisor, activa dos diferentes tipos de receptores: los metabotrópicos y los ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos promueven la síntesis de segundos mensajeros, a través de la activación de efectores, regulados por proteínas G. En el sistema nervioso (SN), se han descrito por lo menos ocho tipos de receptores metabotrópicos glutamatérgicos (R-Glu_m), que se conocen como R-Glu_m1-8, con base en la homología en la secuencia de aminoácidos se clasifican en tres clases funcionales, también se clasifican por los agonistas farmacológicos y por las vías de transducción de señales, a las cuales se acoplan (Dingledine y col., 1999). Los receptores glutamatérgicos ionotrópicos (R-Glu_i) son canales iónicos activados por ligando. La apertura del poro acuoso permite la entrada de Na⁺ o Ca⁺⁺ y la salida de K⁺. El flujo neto de iones a través de estos receptores conduce a la despolarización de la membrana de la célula nerviosa. Los R-Glu_i se clasifican por su afinidad a agonistas específicos en receptores para: N-Metil-D-Aspartato (R-NMDA), para el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol (R-AMPA) y el ácido kaínico (R-KA) (Dingledine y col., 1999).

El Glu juega un papel importante en la función neuronal como en la plasticidad sináptica y procesos cognoscitivos, también en diferentes eventos tóxicos; en

diversos desordenes neurodegenerativos como Parkinson, Huntington, Alzheimer, y otra patologías como isquemia o epilepsia, la excitotoxicidad juega un papel patogénico importante en procesos que culminan en la muerte neuronal programada (Mattson, 2000).

La entrada sostenida de Ca^{++} a la neurona, principalmente a través de los R-Glu_i , y su excesiva acumulación en el citosol y en la mitocondria disparan diversos eventos intracelulares que eventualmente conducen a la muerte celular (Choi DW. 1988, Choi, 1995). La pérdida de la homeostasis del Ca^{++} se debe a la saturación de los mecanismos de regulación como la bomba de Ca^{++} , el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, y las proteínas amortiguadoras de Ca^{++} como la parvalbúmina y la calretinina. Una vez saturados estos sistemas, la mitocondria captura el exceso de Ca^{++} , el cual se acumula en la matriz mitocondrial e induce la despolarización de la membrana mitocondrial por dos mecanismos: a) el abatimiento parcial del potencial quimiosmótico por la acumulación de cargas positivas en la matriz mitocondrial; y b) ante una sobrecarga sostenida, entonces sucede una despolarización irreversible por la activación del poro de transición mitocondrial.

El colapso del potencial quimiosmótico mitocondrial reduce la síntesis de ATP y la activación del poro de transición que constituye una vía por donde el Ca^{++} retorna al citosol (Nicholls y Ward, 2000; Murchison y Griffith, 2000). El aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ promueve la generación de radicales libres, que inducen la peroxidación de lípidos de la membrana, la síntesis de óxido nítrico y la activación de enzimas involucradas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Choi, 1995). Además, el óxido nítrico puede actuar como retromensajero y potenciar el efecto excitotóxico del Glu al aumentar su liberación desde las terminales presinápticas (Almeida y col., 1998). Eventualmente todos estos mecanismos contribuyen al daño irreversible del tejido neuronal (Dugan y Choi, 1999; Nicotera y col., 1992). A pesar de la existencia de numerosos estudios sobre la acción de los niveles neurotóxicos del glutamato en el hipocampo, no se ha caracterizado lo concerniente al modo de muerte celular y la posible vía de señalización involucrada en la neurotoxicidad (Figura 1).

Generalmente se asume que cerca de la mitad de las neuronas que se producen durante la neurogénesis mueren antes de completar la maduración del SN. Además,

caspasas murinas 11 y 12); ii) la subfamilia CED3 (caspasas 3, 6, 7, 8, 9 y 10); y iii) la subfamilia de caspasas 2 (Lossi y Merighi, 2003) (Tabla 1). Entre éstas, las caspasas 3, 6 y 7 tienen un dominio corto y degradan proteínas celulares vitales; las otras tienen un dominio largo que regula la interacción proteína-proteína, y sólo en ciertas circunstancias, quizá solo con excepción de las caspasas 1 y 11, pueden disparar la apoptosis (Thornberry y Lazebnik, 1998).

Tabla 1. Sustratos de caspasas y los cambios estructurales relacionados en células apoptóticas.

Caspasas	Sustrato	Cambios estructurales	Bibliografía
Caspasa 3	DFF45/ICAD; Proteína cinasa Cδ	Condensación y fragmentación de la cromatina	Emoto y col. (1995), Liu y col. (1997, 1998), Cross y col. (2000)
	Fodrin, Gas2, gelsolin, PAK2, vimentina	Modificaciones de la membrana celular y citoesqueleto	Martín y col. (1995), Kothakota y col. (1997), Rudel y Bokock (1997), Bvun y col. (2001)
Caspasa 6	Lamina nuclear, vimentina	Ruptura de la envoltura nuclear. Alteración del citoesqueleto	Lazebnik y col. (1995), Takahashi y col. (1996), Byun y col. (2001)
Caspasa 7	Gas, vimentina	Alteración del citoesqueleto	Sgorbissa y col. (1999), Bvun y col. (2001)

Diferentes grupos de caspasas pueden activarse dependiendo del estímulo proapoptótico; por ejemplo las caspasas 3, 6 y 8 son parte de la vía de muerte mediada por Fas/TNF, mientras que las caspasas 9 y 3 en conjunto con el factor activador de proteasas de apoptosis (Apaf1) y el citocromo c participan en la muerte celular asociada a la mitocondria (Zimmermann y col., 2001). Los blancos moleculares de las caspasas incluyen proteínas estructurales como la laminina, fodrina y actina; además de enzimas reparadoras del DNA, incluyendo la poliADPribosa polimerasa y la topoisomerasa I, así como proteínas reguladoras como el inhibidor de DNasa activado por caspasas (ICAD, por sus siglas en inglés) (Honig and Rosenberg, 2000).

La aplicación de Glu en rebanadas de hipocampo de cerebro de rata promueve la liberación del citocromo c y la activación de caspasas, esto precede a la fragmentación del DNA y por lo tanto la muerte neuronal de tipo apoptótico (Molz y col., 2008). Además, algunas evidencias muestran que en modelos *in vitro* de

excitotoxicidad se induce muerte de tipo necrótica en concentraciones de glutamato en el rango mM, mientras que a dosis μM se induce muerte apoptótica y al parecer que la vía de muerte difiere en función de la concentración de Glu; ya que al aplicar una dosis de 10 μM de Glu se induce muerte neuronal sin la participación mitocondrial y no se observa la liberación del citocromo c (Molz y col., 2008). Se sugiere entonces que la especificidad se alcanza a través de la expresión y activación específica de proteínas de muerte celular, dependientes del tipo celular, del tiempo y del estímulo.

FAMILIA DE PROTEÍNAS Bcl-2

El nombre de Bcl-2 se le da a toda una familia de proteínas homólogas de los miembros anti-apoptóticos o factores de sobrevivencia, que inhiben la muerte celular por apoptosis como el propio Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, etc.; y de los miembros pro-apoptóticos o promotores de la apoptosis, como el Bax, el miembro mejor estudiado, además de Bcl-XS, Bak, Bad, Bik, Bid, etc. En cada grupo, todos sus miembros parecen tener las mismas funciones aunque hay células que tienen preferencia por emplear a un determinado factor de sobrevivencia (Yuan, 2000). La proporción entre ambos grupos determina la susceptibilidad de las células frente las señales de muerte. La estructura de todas estas proteínas posee entre uno y cuatro dominios α -hélice BH (dominios Bcl-2 de homología) que se conservan, llamados BH4, BH3, BH1 y BH2; según el orden en el que aparecen desde el extremo N-terminal. Se ha observado que en ausencia de señales de muerte, los miembros que constituyen la familia Bcl-2, presentan una localización subcelular diferente, que depende estructuralmente de si poseen una región transmembranal (TM) en el extremo C-terminal; la presencia de esta región permite su asociación con membranas del retículo endoplásmico, núcleo, o con la membrana mitocondrial externa, estas proteínas pertenecen a los miembros anti-apoptóticos; mientras que las que no poseen esta región TM (miembros pro-apoptóticos) o la presentan con una mutación, se localizan en el citosol o bajo condiciones de daño se ha observado que se asocian a membranas intracelulares, presumiblemente por su interacción con los miembros de la familia que sí poseen la región TM (revisado en Bowen y col., 1998; Gross y col., 1999).

Los miembros de la familia de Bcl-2 ejercen su función al dimerizarse a través de los dominios BH, pudiendo formar homodímeros (Bcl-2/Bcl-2, Bax/Bax, Bcl-XL /Bcl-XL y Bcl-XS/Bcl-XS) o heterodímeros (Bcl-2 con Bax, Bcl-XS, A1 y Bad; también Bax con Bcl-XL, Mcl-1 y A1; y además, Bcl-XL con Bcl-XS). El efecto de estas proteínas sobre los fenómenos de muerte o de sobrevivencia, dependerá de su combinación. Así, los homodímeros Bax/Bax promueven la apoptosis mientras que sus heterodímeros con miembros anti-apoptóticos tienen el efecto contrario (Oltvai y col., 1993). Varias de estas proteínas se les ha implicado en la muerte de tipo apoptótica en el sistema nervioso (Greenlund y col., 1995; Tanabe y col., 1997), por ejemplo la sobreexpresión de Bcl-2 en cultivos celulares de ratones transgénicos incrementa la resistencia de las neuronas a la muerte durante el desarrollo (Martinou y col., 1994), y protege de la apoptosis inducida por excitotoxicidad, daño oxidativo y metabólico (Mattson, 2000). Por otra parte Bcl-XL es crítico para la sobrevivencia de neuronas durante el desarrollo embrionario; los ratones deficientes en Bcl-XL mueren durante la embriogénesis probablemente por una muerte celular masiva que ocurre en el desarrollo del SNC (Motomaya y col., 1995). En contraste a la función de sobrevivencia de Bcl-2 y Bcl-XL, la proteína Bax promueve la apoptosis de neuronas en el sistema nervioso; las neuronas que carecen de esta proteína están protegidas en contra de la apoptosis inducida por la privación de factores de crecimiento (Deckwerth y col., 1996). Las proteínas con solo BH3 comprenden una sub-familia de proteínas pro-apoptóticas (Huang y Strasser 2000), a través de la transducción de señales apoptóticas hacia la maquinaria de muerte mediada por la vía mitocondrial (Puthlakath y Strasser 2002).

PROTEÍNA APAF-1

Las señales de muerte en las cuales se encuentran involucrados componentes mitocondriales se acoplan a vías efectoras a través de APAF-1; una proteína adaptadora que se activa después de la liberación del citocromo c de la mitocondria, constituyendo un complejo multiproteico, llamado apoptosoma (Adams y Cory 2002); este complejo se conforma además por dATP y la caspasa 9, lo que induce la activación de la caspasa 3, que resulta en la fragmentación del DNA y la apoptosis (Zuo y col., 1997). Ratones nulos, para Apaf-1 mueren durante la embriogénesis

tardía y muestran apoptosis reducida en el cerebro (Cecconi y col., 1998), lo que sugiere que Apaf-1 participa en la activación de la maquinaria apoptótica, durante el desarrollo neuronal.

FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS (AIF)

Otra proteína que normalmente se localiza en el espacio intermembranal de la mitocondria es el factor inductor de apoptosis (AIF). AIF es una flavoproteína, la cual tiene homología con la óxido-reductasa bacteriana. En la vía de muerte, AIF se transloca al núcleo y se une al DNA, lo que provoca la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA, aparentemente de una manera independiente de caspasas. La sobreexpresión de Bcl2 previene la liberación de AIF de la mitocondria, aunque no su actividad apoptogénica (Susin y col., 1999). Datos recientes muestran que AIF se libera de la mitocondria por un mecanismo diferente al del citocromo c, probablemente por mediación de la *poly-(ADP-ribose)-polymerase* (PARP-1).

PROTEÓLISIS DE PARP COMO INDICADOR DE APOPTOSIS

La PARP es una enzima nuclear de 116 kDa, implicada en la reparación del DNA, cuya síntesis se activa cuando se produce la fragmentación del DNA y en presencia de proteínas nucleares poli ADP-ribosiladas. En una fase temprana de la apoptosis las caspasas fragmentan a la PARP por proteólisis, obteniéndose un fragmento de 89 kDa y otro de 24 kDa, esta pequeña fracción es la responsable de su actividad, ya que al quedar libre, se une de forma irreversible a los extremos del DNA fragmentado e impide el acceso de las enzimas reparadores del DNA, de tal forma que la proteólisis de la PARP facilita la desorganización nuclear y asegura la irreversibilidad del proceso apoptótico (Oliver y col., 1999). La fragmentación de la PARP también puede producirse durante la necrosis pero de forma diferente, obteniéndose fragmentos de distinto tamaño a los que se producen durante la apoptosis (Guillouf y col., 1999).

MUERTE CELULAR Y ELEMENTOS DEL CICLO CELULAR.

Tanto la ausencia de señales de sobrevivencia, así como la activación de vías apoptóticas dispara la muerte celular neuronal. Muchas de estas vías de señalización

conducen a la activación o supresión de la maquinaria de muerte celular que se ha caracterizado en los últimos años (para revisión ver Becker y Bonni, 2004). La mayoría de las vías apoptóticas convergen sobre un número restringido de vías efectoras comunes. Los datos de experimentos recientes sugieren que el reingreso al ciclo celular representa un mecanismo clave adicional de la apoptosis neuronal (Liu y Greene, 2001). La reactivación de los componentes del ciclo celular se observa frecuentemente, en células del SN en diferentes etapas del desarrollo, relacionándose con la ejecución de la muerte de tipo apoptótico. Durante mucho tiempo, se ha postulado, que la estirpe neuronal, después de completar su diferenciación, desiste de forma permanente de continuar en el ciclo celular (Hayes y col., 1991 y Okano y col., 1993). De manera contradictoria a este dogma, un gran número de evidencias indican que las neuronas tienen la capacidad de reingresar al ciclo celular. Sin embargo, en estas condiciones la maquinaria reguladora del ciclo celular raramente conduce a la proliferación, de hecho, se ha observado que induce muerte celular apoptótica (Wartiovaraa y col., 2002).

Heintz en 1993, propuso que un estímulo puede inducir un proceso de desdiferenciación celular en neuronas maduras, incluyendo la reactivación del ciclo celular (Heintz, 1993). La activación insuficiente y errónea de algunos elementos del ciclo celular no permite a las células reingresar a la fase S del ciclo celular. Tres familias de proteínas son las responsables principales de la regulación del ciclo celular: las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs, por sus siglas en inglés) y los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs, por sus siglas en inglés). Las ciclinas son un grupo de proteínas, cuya abundancia varía durante el ciclo celular, ellas se asocian con la CDK específica, la activan y por lo tanto promueven la fosforilación de sustratos específicos al tipo de CDK.

Las células eucariotas han desarrollado puntos de control para protección ante una variedad de diferentes tipos de daño o estrés, que resultan en el daño al DNA; los cuales retardan la progresión a la fase siguiente del ciclo celular y activan la reparación del DNA. Cuando el daño al DNA es irreparable, los puntos de control favorecen la eliminación de las células dañadas potencialmente perjudiciales para las células, por el arresto permanente en una fase del ciclo celular (Bartek y Lukas, 2001).

Las ciclinas y entre ellas la ciclina D1, juega un papel importante en la progresión de la fase G1 del ciclo celular y se asocia con cinasas dependientes de ciclinas (Sherr, 1993), como CDK4 y 6, que fosforilan blancos como la proteína supresora de tumores del retinoblastoma (Rb, por sus siglas en inglés). Una vez hiperfosforilada la Rb, el complejo E2F-Rb se libera y E2F modula la transcripción de genes que promueven el paso de la fase G1 a la S del ciclo celular (Stevaux y Dyson, 2002). Así, se ha observado que la inhibición de la vía p38 atenúa parcialmente los eventos de apoptosis, inducidos por la aplicación de ácido kaínico y se sugiere que los sustratos de esta vía de señalización se modulan por componentes reguladores del ciclo celular (Giardina y Beart, 2002). Estudios recientes en el mapeo de expresión génica de los elementos que conforman las vías de señalización de proteínas cinasas asociadas a mitógenos (MAPK) en el hipocampo de rata después del daño excitotóxico inducido por la administración de glutamato monosódico, demuestran que tanto los componentes de la vía de JNK/MAPK, como algunos de los efectores finales (en su mayoría componentes reguladores del ciclo celular) modifican sus niveles de expresión después de la inducción del daño (Tabla 2).

Tabla 2. Cambios en la expresión de genes relacionados con la regulación del ciclo celular, en el hipocampo de ratas en condiciones de daño excitotóxico.

Día	Gen modificado	Expresión	Características
5 ^{to} día, 6hr	Cdkn2a (p16)	<i>Disminución en la expresión</i>	Se encarga de inhibir a los complejos cdk4, 6 – ciclina D, responsables de la progresión del ciclo celular de la fase G1 en el punto de restricción.
6 ^{to} día	Ccnd2 (ciclina D2)	<i>Disminución en la expresión</i>	Ciclina asociada con las cdk4, 6 y forman el complejo que se encarga de fosforilar la Rb y liberar el factor de transcripción E2F en el punto de restricción de la fase G1
	Cdkn2a (p16)	<i>Disminución en la expresión</i>	Se encarga de inhibir a los complejos cdk4, 6 – ciclina D, responsables de la progresión del ciclo celular de la fase G1 en el punto de restricción.
7 ^{mo} día, 6hr	Cdkn2a (p16)	<i>Disminución en la expresión</i>	Se encarga de inhibir a los complejos cdk4, 6 – ciclina D, responsables de la progresión del ciclo celular de la fase G1 en el punto de restricción.
	Cdkn2d	<i>Disminución en la expresión</i>	Se une a las Cdk4 y 6 lo que previene la activación de las cinasas por lo tanto la función como regulador del crecimiento celular que controla la progresión del ciclo celular G1
	Ccnd2 (ciclina D2)	<i>Expresión a la alta</i>	Ciclina asociada con las cdk4, 6 y forman el complejo que se encarga de fosforilar la Rb y liberar el factor de transcripción E2F en el punto de restricción de la fase G1
	Retinoblastoma 1	<i>Expresión a la alta</i>	Inhibe el factor de transcripción E2F (necesario para el progreso de G1 a S)
8 ^{vo} día	Ccnd2 (ciclina D2)	<i>Disminución en la expresión</i>	Ciclina asociada con las cdk4, 6 y forman el complejo que se encarga de fosforilar la Rb y liberar el factor de transcripción E2F en el punto de restricción de la fase G1
	Cdkn2a (p16)	<i>Disminución en la expresión</i>	Se encarga de inhibir a los complejos cdk4, 6 – ciclina D, responsables de la progresión del ciclo celular de la fase G1 en el punto de restricción.
	Cdkn2b (p15)	<i>Expresión a la alta</i>	Inhibidor adyacente a Cdkn2a, que actúa sobre las Cdk4, 6 y previene la activación con la ciclina D, por lo tanto es un regulador del crecimiento celular que controla la progresión del ciclo celular en la fase G1.

Estos resultados permiten proponer que la disminución en la expresión del RNA mensajero para algunos de los inhibidores del ciclo celular, así como el incremento de la expresión del gen para la proteína del Rb, podrían conducir al reingreso de las células al ciclo celular, lo que en el caso de las neuronas podría inducir la ejecución de eventos que llevarían a la célula a la muerte como se ha propuesto en numerosos trabajos (para revisión ver Becker y Ovni, 2004).

Aunque son múltiples las vías de señalización que convergen en la ejecución de los programas de muerte celular, inducidos por excitotoxicidad, han surgido evidencias de que las proteínas del ciclo celular se modifican en su expresión y activación, por lo que se les ha asociado a los mecanismos fundamentales de la ejecución del daño celular apoptótico. En el futuro los esfuerzos combinados, utilizando tanto modelos de daño celular *in vivo* e *in vitro*, como con estudios clínicos, podría conducirnos a identificar blancos potenciales para el desarrollo de tratamientos de amplio rango, con el fin de evitar la ejecución de los eventos neurodegenerativos, asociados a la excitotoxicidad, sin afectar funciones neurológicas sustantivas del sistema nervioso, en diferentes enfermedades cerebrales.

Agradecimientos

El trabajo ha sido financiado por el Comité Técnico del Fideicomiso UDG/PROMEPE, programa de exbecarios según oficio 103.5/05/828.

REFERENCIAS

1. Adams JM, Cory S (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:715–720.
2. Almeida A, Heales SJR, Bolaños JP, Medina JM (1998). Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res* 790:209–216.
3. Bartek J, Lukas J (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 738–747.
4. Bowen ID, Bowen SM, Jones AH (1998). The structural and physiological basis of apoptosis and mitosis. En: *Mitosis and apoptosis. Matters of life and death.* London: Chapman & Hall.
5. Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K.J., Cryns, V.L., 2001. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* 8, 443–450
6. Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P, (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94:727–737.
7. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb M (2001). MAP kinases. *Chem Rev* 101:2449–2476
8. Choi DW (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465–469.

9. Choi DW (1995). Calcium: still center stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18:58-60.
10. Cross, T., Griffiths, G., Deacon, E., Sallis, R., Gough, M., Watters, D., Lord, J.M., 2000. PKC-delta is an apoptotic lamin kinase. *Oncogene* 19, 2331-2337.
11. Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson Jr EM, Snider WD, Korsmeyer SJ (1996). BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17:401-411.
12. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). The glutamate receptors ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
13. Dugan LL, Choi DW (1999). Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. En *Basic Neurochemistry*. Editores: Siegel JG, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. Lippincott-Raven Press, PH. pp 711-729.
14. Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W.W., Kamen, R., Weichselbaum, R., 1995. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* 14, 6148-6156.
15. Esther B.E. Becker y Azad Bonn (2004). Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Progress in Neurobiology* 72:1-25 Hayes TE, Valtz NL, McKay RD (1991). Downregulation of CDC2 upon terminal differentiation of neurons. *New Biol.* 3: 259-269.
16. Greenlund LJ, Korsmeyer SJ, Johnson Jr EM (1995). Role of BCL-2 in the survival and function of developing and mature sympathetic neurons. *Neuron* 15:649-661.
17. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Gene Dev.* 13:1899-911.
18. Guillouf C, Wang TS, Liu J, Walsh CE, Poirier GG, Moustacchi E, Rosselli F, Fanconi (1999). anemia C protein acts at a switch between apoptosis and necrosis in mitomycin C-induced cell death. *Exp Cell Res.* 246:384-94.
19. Heintz N (1993). Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem. Sci.* 18:157-159.
20. Hengartner MO (2001). Apoptosis: corralling the corpses. *Cell.* 104:325-8.
21. Honig LS, Rosenberg RN (2000). Apoptosis and neurologic disease. *Am. J. Med.* 108:317-330.
22. Huang DC, Strasser A (2000). BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103:839-842.
23. Kaufmann JA, Bickford PC, Tagliatalata G (2001). Oxidative-stress dependent up-regulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher-344 rats. *J. Neurochem.* 76:1099-1108.
24. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological changes in apoptosis. *Science* 278, 294-298.
25. Lazebnik, Y., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., Eamshaw, W.C., 1995. Studies on the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9042-9046.
26. Liu, D.X., Greene, L.A., 2001. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res.* 305: 217-228.
27. Liu, Q.A., Hengartner, M.O., 1998. The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 887, 92-104.
28. Lossi L, Merighi A (2003). In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol.* 69:287-312.
29. Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C., Green, D.R., 1995. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270, 6425-6428.
30. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C (1994). Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13:1017-1030.
31. Mattson MP, (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:120-129.
32. Molz S, Decker H, Dal-Cim T, Cremonese C, Cordova FM, Leal RB, Tasca CI (2008). Glutamate - induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res.* 33:27-36.
33. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267:1506-1510.

34. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C (1994). Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13:1017-1030.
35. Mattson MP, (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:120-129.
36. Molz S, Decker H, Dal-Cim T, Cremonez C, Cordova FM, Leal RB, Tasca CI (2008). Glutamate - induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res.* 33:27-36.
37. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267:1506-1510.
38. Mattson M (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:120-129.
39. Murchinson D, Griffith HW (2000). Mitochondria buffer non-toxic calcium loads and release calcium through the mitochondrial permeability transition pore and sodium/calcium exchanger in rat basal forebrain neurons. *Brain Res* 854:139-151.
40. Nicholls DG, Ward MW (2000). Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends in Neurosci* 23:166-174.
41. Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S (1992). Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32:449-70.
42. Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease. *Am J Hum Genet.* 64:1282-1288.
43. Okano HJ, Pfaff DW, Gibbs R.B (1993). RB and Cdc2 expression in brain: correlations with 3H-thymidine incorporation and neurogenesis. *J. Neurosci.* 13:2930-2938.
44. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619.
45. Puthalakath H, Strasser A, (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 9:505-512.
46. Rudel, T., Bokock, G.M., 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276, 1571-1574.
47. Sastry PS, Rao KS (2000). Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem.* 74(1):1-20.
48. Sgorbissa, A., Benetti, R., Marzinotto, S., Schneider, C., Brancolini, C., 1999. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J. Cell Sci.* 112, 4475-4482.
49. Sherr CJ (1993). G1 cyclins *Cell* 73:1059-1065
50. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G, (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
51. Stevaux O, Dyson NJ (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:684-691.
52. Takahashi, A., Alnemri, E.S., Lazebnik, Y., Fernandez-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., Eamshaw, W.C., 1996. Cleavage of lamin A by Mch2_ but not CPP32: multiple interleukin-1_ converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8395-8400.
53. Tanabe H, Eguchi Y, Kamada S, Martinou JC, Tsujimoto Y (1997). Susceptibility of cerebellar granule neurons derived from Bcl-2- deficient and transgenic mice to cell death. *Eur. J. Neurosci.* 9:848-856.
54. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within *Science.* 28; 281:1312-6.
55. Wartiovaara K, Barnabe-Heider F, Miller FD, Kaplan DR, (2002). N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 22: 815-824
56. Yuan J, Yankner BA (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
57. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92:57-70.
58. Zuo J, De Jager PL, Takahashi KA, Jiang W, Linden DJ, Heintz N, (1997). Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 388:769-773.

5

IMPLICACIÓN DE LA VÍA JNK EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

^{1,2}Junyent F, ¹de Lemos L, ¹Porquet D, ³Ferrer I, ⁴Romero R, ⁵Auladell C.

¹Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

²Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España.

³Servei Anatomia Patològica, Institut de Neuropatologia, CIBERNED, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, España.

⁴Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

⁵Departament de Biologia Celular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MAPK

Las MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) son proteínas quinasas treonina(Thr)/tirosina(Tyr) o serina(Ser)/treonina(Thr) que median señales intracelulares, asociadas con diversos procesos celulares, como proliferación, diferenciación, transformación, supervivencia y muerte celular (35). La familia MAPK de mamíferos está constituida por la ERK (quinasa regulada por señal extracelular), la p38, y c-Jun NH2-terminal quinasa (JNK) también conocida como proteína quinasa activada por estrés (SAPK; *stress-activated protein kinase*). Cada uno de estos enzimas se presenta bajo la configuración de diferentes isoformas: de ERK1 a ERK8; p38- α , - β , - γ , y - δ ; y de JNK1 a JNK3 (52). Cada vía de señalización MAPK comprende, al menos, tres componentes: quinasa MAP3K, quinasa MAP2K y quinasa MAPK que se activan por fosforilación secuencial (67). Las MAPK activadas fosforilan diferentes substratos proteicos, incluyendo factores de transcripción como Elk-1, c-Jun, ATF2 y p53. Las vías MAPK se mantienen activadas como resultado de interacciones binarias de diferentes quinasas o a través de la formación de un complejo que contiene múltiples quinasas. Así la quinasa supresora Ras-1 (KSR) y la MEK *partner* 1 (MP1) funcionan como proteínas de interacción en la vía

de señalización de ERK, mientras que las JIPs son proteínas de interacción de la vía JNK. La β -Arrestin 2 actúa como proteína de interacción para la vía de señalización de ERK y de JNK (40, 65).

VÍA DE SEÑALIZACIÓN JNK

En mamíferos se han identificado tres genes que codifican para JNKs (*Jnk1*, *Jnk2* y *Jnk3*) y diversas isoformas resultantes de un “*splicing*” alternativo de estos genes. Así, mientras que JNK1 y JNK2 están ampliamente distribuidas por los tejidos, JNK3 está básicamente localizada en las neuronas en el sistema nervioso y en un nivel más bajo en corazón y testículo.

Específicamente, JNK es activada por fosforilación a través de MKK4 (MAPKK) que a su vez se activa por fosforilación de ASK1 o MEKK1 (MAPKKK) (14, 47, 58). La máxima activación de JNK se consigue cuando hay fosforilación en los residuos de Thr y Tyr. Mientras que la fosforilación de Thr por MKK7, activa significativamente JNK3, la fosforilación de sólo la Thr por MKK4, induce bajos niveles de JNK3 activada (33). Estas quinasas están reguladas por otras quinasas upstream como cdc42, Rac1, PAK1 que conectan con distintos receptores sensibles al estrés y a la inflamación. Por tanto, una gran diversidad de estímulos pueden activar la vía JNK (64).

La activación de JNK conlleva la fosforilación de múltiples dianas, existiendo más de 50 substratos identificados (4). Dado que la JNK activada puede traslocarse al núcleo fosforila substratos nucleares los cuales, a parte, de algunos receptores hormonales, son factores de transcripción, como los factores AP-1 de la familia Jun (c-Jun, JunB, JunD), Elk-1, p53, el factor-2 de transcripción anti-activación (ATF-2), JDP2, c-Myc, de la familia NFAT, de la familia STAT y de la familia PAX (4). Para muchos de estos factores como c-Jun, ATF2, Elk-1 y p-53, la fosforilación incrementa su actividad transcripcional y en consecuencia induce expresión génica (4, 25).

El substrato mejor identificado de JNK es c-Jun, aunque no se conoce cual es papel de cada isoforma de JNK respecto a su fosforilación. Una alta expresión del gen *c-jun* y de la proteína precede o coincide con periodos de muerte celular, como el que se da durante el desarrollo embrionario (57), después de un trauma (22, 26, 44), en la isquemia cerebral (29, 62) y tras convulsiones (18, 20, 39). Una inducción similar, se detecta en enfermedades humanas neurodegenerativas, como el Alzheimer (43, 59),

la esclerosis lateral amiotrófica (37) y ante la exposición a neurotóxicos como el MPTP, inductor de la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, un modelo de la enfermedad de Parkinson (42, 50). Precisamente en esta enfermedad, la inhibición de JNK o de las señales “*upstream*” puede reducir la muerte neuronal dopaminérgica mediada por MPTP (49, 61, 69), sugiriendo una posible aplicación terapéutica en la enfermedad de Parkinson (6, 54). Así, las c-Jun N-terminal quinasas (JNK) son importantes mediadores de la neurodegeneración y su acción incluye la activación de programas genéticos, la fosforilación del factor de transcripción nuclear c-Jun/AP-1, la liberación del citocromo c o la acción pro-inflamatoria de la microglia. Parece que JNK2 y JNK3 tienen una acción más directa en la activación de los factores de transcripción que JNK1, pues algunos datos apuntan que la activación de JNK1 no es responsable de la fosforilación de los sustratos finales de la vía, incluyendo c-Jun (11, 12). En este sentido, a JNK1 y JNK2 se les han imputado funciones relacionadas con el control en el desarrollo del cerebro (9, 31, 48, 63), en concreto, se conoce su implicación en los procesos apoptóticos que ocurren en el desarrollo neuronal (9, 31). Sin embargo, experimentos con animales knock-out han revelado que todas las isoformas JNK pueden ser claves para el correcto desarrollo neuronal (17). También, a partir de un modelo de meningitis neumococal de rata neonatal se han imputado papeles diferenciales para las diferentes isoformas de JNK, así, la activación de c-Jun está acompañada de la activación de JNK3 pero no de JNK1/2 (21). Todos estos resultados ponen de manifiesto que existen aún muchos interrogantes acerca de las funciones concretas de las diferentes isoformas de JNK.

CONTROL DE LA VÍA JNK Y NEUROPROTECCIÓN

La vía JNK ha sido relacionada en modelos *in vivo* e *in vitro* de neurodegeneración, inducida por glutamato, ácido kaínico (KA) y privación neurotrófica (3, 53, 70). Además, la activación de JNK se ha descrito en enfermedades neurodegenerativas crónicas como el Alzheimer y el Parkinson (7, 46). También se ha demostrado el efecto deletéreo de la activación de JNK en modelos experimentales de la enfermedad de Huntington (19, 34). De las tres isoformas de JNK (JNK1-3), JNK3 ha sido la más comprometida con procesos apoptóticos neuronales inducidos por

aminoácidos excitadores o por isquemia cerebral (8, 30, 70). Así, la primera evidencia de la implicación de JNK en la excitotoxicidad, deriva de la reducción de la actividad convulsionante y prevención de la apoptosis en ratones deficientes para JNK3, tratados con ácido kaínico (KA) (70). También ratones con una forma inactiva del gen *c-jun* (Jun AA, con alanina en lugar de la serina 63 y 73) confieren resistencia a la muerte neuronal por excitotoxicidad, sugiriendo que prevenir el acceso de la quinasa JNK al substrato c-Jun puede causar neuroprotección (3). Estos resultados hacen que JNK se presente como una diana para la protección contra la muerte neuronal, de ahí el esfuerzo en encontrar inhibidores de JNK. En este sentido, se pueden destacar dos inhibidores químicos, el CEP-1347, inhibidor de la familia MLK de la vía JNK y el SP600125, inhibidor directo de la actividad de JNK.

Como se ha comentado anteriormente, la actividad JNK puede ser regulada por JIPs (*JNK-interacting proteins*), específicamente por JIP-1, una proteína que integra los reguladores positivos y negativos de JNK, facilitando la actividad de la vía de señalización JNK (66, 68) por su alta especificidad (45). De este modo JIP-1 en ratones o IB-1, su homólogo en ratas y humanos, contienen dominios de unión a JNK (JBD) que median el secuestro de JNK en el citoplasma, inhibiendo la expresión de genes que se activan por la vía de señalización de la JNK y actúan como inhibidores funcionales de JNK (2, 15, 38). Además, JIP-1 anula los efectos de JNK en la apoptosis y en la transformación celular maligna (15). En base a las propiedades de la proteína JIP-1 se ha desarrollado un nuevo agente con acción sobre la vía y con capacidad neuroprotectora, el péptido permeable D-JNKI1. Este péptido protege ante diferentes modelos de excitotoxicidad *in vitro*, asimismo su papel neuroprotector se ha evidenciado en un modelo murino de isquemia, evitando la muerte celular con una amplia ventana terapéutica (5). Así, D-JNKI1 más que inhibir la actividad enzimática de JNK, como hacen los inhibidores químicos clásicos, bloquea selectivamente el acceso de JNK a diferentes substratos, previniendo la interacción proteína-proteína sin interferir en su activación. En concreto, D-JNKI1 previene la fosforilación de c-Jun ya que mimetiza el dominio JBD de JIP-1.

Ante lo expuesto es evidente que la inhibición de JNK, ya sea a través de fármacos inhibidores o través de péptidos con dominio de unión de las proteínas de JNK, actúa como un potente neuroprotector. Sin embargo, neutralizar la vía JNK presenta

limitaciones debido a las funciones biológicas que realiza. Por ejemplo, se ha visto que los inhibidores de JNK permiten el rescate de neuronas axotomizadas pero previenen su regeneración (60, 41). Este problema solo puede solventarse con dianas específicas dirigidas contra moléculas concretas de la vía, sin embargo ello requiere más información acerca de las acciones individuales de las diferentes isoformas de JNK. En este sentido, algunos trabajos han permitido sugerir una posible diana de la vía JNK para atenuar la apoptosis sin afectar las funciones fisiológicas, en concreto, la inhibición del complejo mitocondrial MKK-JNK3 (72).

LA VÍA JNK MODULA LA VÍA DE AKT

En células expuestas a situaciones de estrés hay inducción de señales que median la muerte celular o, alternativamente, vías de supervivencia que conllevan a la tolerancia y/o a la recuperación inducida por el daño. Esta activación paradójica de las dos respuestas, pro- y antiapoptóticas, ante un mismo estímulo asegura que ninguna supervivencia aberrante o muerte inapropiada ocurra. La familia de las AKT son importantes mediadores de la supervivencia celular en respuesta a factores de crecimiento y a estímulos que provocan la entrada de calcio (16, 71). Cuando el factor trófico se une específicamente a su receptor, se activa la PI3K e induce la formación del fosfatidilinositol fosfato, PIP3 (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*), en la cara citosólica de membrana plasmática (10). La quinasa AKT no es activada directamente por PIP3 pero es transportada hacia la membrana plasmática, debido a la alta afinidad de su dominio de homología pleckstrina (PH, *pleckstrin homology*) con el fosfatidilinositol fosfato, alterándose su conformación y permitiendo su posterior fosforilación (1). La fosforilación debe ocurrir en los residuos Thr-308 y Ser-473 para la activación de AKT. Se ha propuesto que las quinasas AKT fosforilan directamente proteínas pro-apoptóticas, produciendo una supresión de las señales de muerte (13, 32). Uno de los efectos directos sobre la vía apoptótica conlleva la regulación negativa de la vía SAPK/JNK, así en muchos sistemas celulares, la actividad JNK puede ser antagonizada por la actividad AKT quinasa, y ello puede favorecer muchos de los efectos pro-supervivencia descritos para AKT (27, 51). En este sentido, se ha demostrado una reducción en el daño neuronal, tras una isquemia cerebral, al inhibirse la vía JNK por activación de la vía

AKT mediada por los receptores de glutamato (36). Otros resultados soportan la interferencia entre la vía JNK y la vía AKT por acción de la proteína de interrelación JIP-1 que tiene la capacidad de unirse a ambas quinasas (28, 55, 56).

MODELOS EXPERIMENTALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS (KNOCKOUT) DE LA VÍA JNK

Estudiar el papel de c-Jun *in vivo* en el sistema nervioso presenta la dificultad de que los ratones *knockout* para *c-Jun* mueren durante el desarrollo embrionario (E12) por un fallo hepático (5, 24). Por el contrario, los *knockout* para los genes *Jnk* de mamífero, *Jnk1*, *Jnk2*, y *Jnk3* son viables y a partir de ellos si ha sido posible obtener información acerca de la vía JNK. Los ratones *knockout Jnk3 (-/-)* sobreviven al desarrollo siendo viables y mostrando una estructura cerebral normal (70). En comparación con los ratones salvajes, *Jnk3 (-/-)* son menos sensibles a los efectos del ácido kaínico, inductor de convulsiones y muerte en neuronas del área CA1 y CA3 de hipocampo. Ello sugiere que JNK3 es necesaria para la inducción del estrés neuronal y la apoptosis en el hipocampo adulto. También han sido relevantes los resultados obtenidos en ratones en los cuales el gen *c-jun* se ha reemplazado por un mutante, el gen *JunAA*, en el que los codones para la serina 63 y 73 se han cambiado por alanina. Igual que en el ratón *Jnk3(-/-)*, el ratón con el gen *JunAA* sobrevive al desarrollo y evita la muerte neuronal de las áreas hipocampales CA1 y CA3 tras inyecciones con ácido kaínico, sugiriendo que c-Jun es el sustrato clave para JNK3 en el modelo del ácido kaínico (3). La disrupción solo de *Jnk1* y *Jnk2* no afecta al sistema nervioso pero un doble ratón *knockout Jnk1 (-/-) Jnk2 (-/-)* muere durante el desarrollo embrionario con alteraciones importantes en el fenotipo neural (31, 48). Así, a pesar de que las proteínas JNKs y c-Jun son pro-apoptóticas en diferentes tipos celulares, pueden tener otras funciones como ya se ha mencionado. Así, la inducción de la regeneración axonal en las neuronas periféricas axotomizadas en un organismo adulto parece estar asociada al incremento en la expresión de c-Jun, sugiriendo que este factor de transcripción regula la expresión de genes relacionados con la regeneración (23). También con el modelo experimental en rata neonatal de meningitis neumococcal, se ha evidenciado que la fosforilación de c-Jun en esta enfermedad, en contraposición a otros modelos de daño cerebral, no está asociada a

los procesos de apoptosis (21). Además, dado que a las fases agudas de la meningitis neumococal les sigue un incremento en la neurogénesis (21), es posible que JNK esté involucrada en la iniciación de un proceso de reparación después de un daño.

REFERENCIAS

1. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. 1997. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272(50):31515-31524.
2. Barr RK, Kendrick TS, Bogoyevitch MA. 2002. Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity. *J Biol Chem* 277(13):10987-10997.
3. Behrens A, Sibilina M, Wagner EF. 1999. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21(3):326-329.
4. Bogoyevitch MA, Kobe B. 2006. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(4):1061-1095.
5. Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C. 2003. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* 9(9):1180-1186.
6. Borsello T, Forloni G. 2007. JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Curr Pharm Des* 13(18):1875-1886.
7. Bozyczko-Coyne D, Saporito MS, Hudkins RL. 2002. Targeting the JNK pathway for therapeutic benefit in CNS disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1(1):31-49.
8. Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willeßen M, Nicolaus T, Raivich G, Wessig J, Waetzig V, Goetz M, Claussen M, Pearse D, Kuan CY, Vaudano E, Behrens A, Wagner E, Flavell RA, Davis RJ, Herdegen T. 2005. Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur J Neurosci* 21(2):363-377.
9. Chang NS, Doherty J, Ensign A. 2003. JNK1 physically interacts with WW domain-containing oxidoreductase (WOX1) and inhibits WOX1-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 278(11):9195-9202.
10. Chong ZZ, Li F, Maiese K. 2005. Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol Histopathol* 20(1):299-315.
11. Coffey ET, Hongisto V, Dickens M, Davis RJ, Courtney MJ. 2000. Dual roles for c-Jun N-terminal kinase in developmental and stress responses in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 20(20):7602-7613.
12. Coffey ET, Smiciene G, Hongisto V, Cao J, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ. 2002. c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons. *J Neurosci* 22(11):4335-4345.
13. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13(22):2905-2927.
14. Davis RJ. 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* 19(11):470-473.
15. Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg ME, Sawyers CL, Davis RJ. 1997. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 277(5326):693-696.
16. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275(5300):661-665.
17. Eminel S, Roemer L, Waetzig V, Herdegen T. 2008. c-Jun N-terminal kinases trigger both degeneration and neurite outgrowth in primary hippocampal and cortical neurons. *J Neurochem* 104(4):957-969.
18. Gall C, Lauterborn J, Isackson P, White J. 1990. Seizures, neuropeptide regulation, and mRNA expression in the hippocampus. *Prog Brain Res* 83:371-390.
19. Garcia M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E, Caboche J. 2002. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J Neurosci* 22(6):2174-2184.

20. Gass P, Herdegen T, Bravo R, Kiessling M. 1993. Spatiotemporal induction of immediate early genes in the rat brain after limbic seizures: effects of NMDA receptor antagonist MK-801. *Eur J Neurosci* 5(7):933-943.
21. Gerber J, Bottcher T, Bering J, Bunkowski S, Bruck W, Kuhnt U, Nau R. 2003. Increased neurogenesis after experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Neurosci Res* 73(4):441-446.
22. Herdegen T, Kummer W, Fiallos CE, Leah J, Bravo R. 1991. Expression of c-JUN, JUN B and JUN D proteins in rat nervous system following transection of vagus nerve and cervical sympathetic trunk. *Neuroscience* 45(2):413-422.
23. Herdegen T, Skene P, Bahr M. 1997. The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci* 20(5):227-231.
24. Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF. 1993. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365(6442):179-181.
25. Ip YT, Davis RJ. 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10(2):205-219.
26. Jenkins R, Hunt SP. 1991. Long-term increase in the levels of c-jun mRNA and jun protein-like immunoreactivity in motor and sensory neurons following axon damage. *Neurosci Lett* 129(1):107-110.
27. Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. 2001. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 21(3):893-901.
28. Kim AH, Yano H, Cho H, Meyer D, Monks B, Margolis B, Birnbaum MJ, Chao MV. 2002. Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* 35(4):697-709.
29. Kindy MS, Carney JP, Dempsey RJ, Carney JM. 1991. Ischemic induction of protooncogene expression in gerbil brain. *J Mol Neurosci* 2(4):217-228.
30. Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P. 2003. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25):15184-15189.
31. Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. 1999. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22(4):667-676.
32. Lawlor MA, Alessi DR. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114(Pt 16):2903-2910.
33. Lisnock J, Griffin P, Calaycay J, Frantz B, Parsons J, O'Keefe SJ, LoGrasso P. 2000. Activation of JNK3 alpha 1 requires both MKK4 and MKK7: kinetic characterization of in vitro phosphorylated JNK3 alpha 1. *Biochemistry* 39(11):3141-3148.
34. Liu YF. 1998. Expression of polyglutamine-expanded Huntingtin activates the SEK1-JNK pathway and induces apoptosis in a hippocampal neuronal cell line. *J Biol Chem* 273(44):28873-28877.
35. McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. 2006. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 8(9-10):1775-1789.
36. Miao B, Yin XH, Pei DS, Zhang QG, Zhang GY. 2005. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation. *J Biol Chem* 280(23):21693-21699.
37. Migheli A, Piva R, Atzori C, Troost D, Schiffer D. 1997. c-Jun, JNK/SAPK kinases and transcription factor NF-kappa B are selectively activated in astrocytes, but not motor neurons, in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(12):1314-1322.
38. Mooser V, Maillard A, Bonny C, Steinmann M, Shaw P, Yarnall DP, Burns DK, Schorderet DF, Nicod P, Waeber G. 1999. Genomic organization, fine-mapping, and expression of the human islet-brain 1 (IB1)/c-Jun-amino-terminal kinase interacting protein-1(JIP-1) gene. *Genomics* 55(2):202-208.
39. Morgan JL, Curran T. 1988. Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons. *Cell Calcium* 9(5-6):303-311.
40. Morrison DK, Davis RJ. 2003. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:91-118.
41. Newbern J, Taylor A, Robinson M, Lively MO, Milligan CE. 2007. c-Jun N-terminal kinase signaling regulates events associated with both health and degeneration in motoneurons. *Neuroscience* 147(3):680-692.

42. Oo TF, Henchcliffe C, James D, Burke RE. 1999. Expression of c-fos, c-jun, and c-jun N-terminal kinase (JNK) in a developmental model of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem* 72(2):557-564.
43. Pearson AG, Byrne UT, MacGibbon GA, Faull RL, Dragunow M. 2006. Activated c-Jun is present in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 398(3):246-250.
44. Raivich G, Bohatschek M, Da Costa C, Iwata O, Galiano M, Hristova M, Nateri AS, Makwana M, Riera-Sans L, Wolfer DP, Lipp HP, Aguzzi A, Wagner EF, Behrens A. 2004. The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* 43(1):57-67.
45. Repici M, Borsello T. 2006. JNK pathway as therapeutic target to prevent degeneration in the central nervous system. *Adv Exp Med Biol* 588:145-155.
46. Resnick L, Fennell M. 2004. Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders. *Drug Discov Today* 9(21):932-939.
47. Robinson MJ, Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9(2):180-186.
48. Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF. 1999. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* 89(1-2):115-124.
49. Saporito MS, Brown EM, Miller MS, Carswell S. 1999. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons *In vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 288(2):421-427.
50. Saporito MS, Hudkins RL, Maroney AC. 2002. Discovery of CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of the JNK/SAPK pathway for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Med Chem* 40:23-62.
51. Sarmiere PD, Freeman RS. 2001. Analysis of the NF-kappa B and PI 3-kinase/Akt survival pathways in nerve growth factor-dependent neurons. *Mol Cell Neurosci* 18(3):320-331.
52. Schaeffer HJ, Weber MJ. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19(4):2435-2444.
53. Schwarzschild MA, Cole RL, Hyman SE. 1997. Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *J Neurosci* 17(10):3455-3466.
54. Silva RM, Kuan CY, Rakic P, Burke RE. 2005. Mixed lineage kinase-c-jun N-terminal kinase signaling pathway: a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Mov Disord* 20(6):653-664.
55. Song JJ, Lee YJ. 2005a. Cross-talk between JIP3 and JIP1 during glucose deprivation: SEK1-JNK2 and Akt1 act as mediators. *J Biol Chem* 280(29):26845-26855.
56. Song JJ, Lee YJ. 2005b. Dissociation of Akt1 from its negative regulator JIP1 is mediated through the ASK1-MEK-JNK signal transduction pathway during metabolic oxidative stress: a negative feedback loop. *J Cell Biol* 170(1):61-72.
57. Sun W, Gould TW, Newbern J, Milligan C, Choi SY, Kim H, Oppenheim RW. 2005. Phosphorylation of c-Jun in avian and mammalian motoneurons *in vivo* during programmed cell death: an early reversible event in the apoptotic cascade. *J Neurosci* 25(23):5595-5603.
58. Takeda K, Matsuzawa A, Nishitoh H, Ichijo H. 2003. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct* 28(1):23-29.
59. Thakur A, Wang X, Siedlak SL, Perry G, Smith MA, Zhu X. 2007. c-Jun phosphorylation in Alzheimer disease. *J Neurosci Res* 85(8):1668-1673.
60. Waetzig V, Zhao Y, Herdegen T. 2006. The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol* 80(2):84-97.
61. Wang W, Shi L, Xie Y, Ma C, Li W, Su X, Huang S, Chen R, Zhu Z, Mao Z, Han Y, Li M. 2004. SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 48(2):195-202.
62. Wessel TC, Joh TH, Volpe BT. 1991. *In situ* hybridization analysis of c-fos and c-jun expression in the rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res* 567(2):231-240.
63. Weston CR, Davis RJ. 2002. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 12(1):14-21.
64. Weston CR, Davis RJ. 2007. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19(2):142-149.
65. Whitmarsh AJ. 2006. The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 5):828-832.

66. Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, Davis RJ. 1998. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 281(5383):1671-1674.
67. Whitmarsh AJ, Davis RJ. 1998. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 23(12):481-485.
68. Whitmarsh AJ, Kuan CY, Kennedy NJ, Kelkar N, Haydar TF, Mordes JP, Appel M, Rossini AA, Jones SN, Flavell RA, Rakic P, Davis RJ. 2001. Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* 15(18):2421-2432.
69. Xia XG, Harding T, Weller M, Bieneman A, Uney JB, Schulz JB. 2001. Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10433-10438.
70. Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. 1997. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389(6653):865-870.
71. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. 1998. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396(6711):584-587.
72. Zhao Y, Herdegen T. 2009. Cerebral ischemia provokes a profound exchange of activated JNK isoforms in brain mitochondria. *Mol Cell Neurosci* 41(2):186-195.

6

EXCITOTOXICIDAD Y APOPTOSIS EN LA EPILEPSIA

**¹Lorigados-Pedre L, ²Orozco-Suárez S, ³Morales-Chacón L,
⁴Rocha-Arrieta L.**

¹Depto. Inmunoquímica y ³Depto. Neurofisiología, Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). La Habana. Cuba.

²Unidad de Investigaciones Médicas en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, CMN, Siglo XXI, IMSS, México.

⁴Lab. Farmacobiología, CINVESTAV, Sede Sur, D.F., México.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un padecimiento neurológico de evolución crónica, recurrente y frecuentemente progresivo que afecta del 1 al 2 % de la población mundial, modelos experimentales y estudios de imágenes en pacientes con este padecimiento muestran que las crisis recurrentes producen estrés oxidativo, relacionado principalmente con la excitabilidad neuronal. La excesiva estimulación de los receptores a glutamato induce neurotoxicidad, un proceso que ha sido definido como excitotoxicidad. Este proceso se considera que puede ser el mayor mecanismo de muerte celular en un gran número de padecimientos del sistema nervioso central incluyendo la epilepsia. Se han realizado diversos estudios en modelos experimentales de epilepsia para conocer los mecanismos de muerte celular, obteniéndose datos muy importantes sobre la inducción de la maquinaria molecular de la apoptosis. En el presente capítulo los autores repasan las evidencias clínicas y experimentales sobre las alteraciones del sistema glutamatérgico, las vías de muerte celular: la intrínseca (mitocondrial) y la extrínseca (por receptores de muerte), la función de la apoptosis después de las crisis, la activación de las caspasas y de la familia de genes Bcl-2 involucrados, como moduladores de la muerte celular.

CONCEPTO DE EXCITOTOXICIDAD

Diversos hallazgos experimentales y clínicos relacionados con la posible toxicidad de los aminoácidos excitadores han dado lugar a la teoría excitotóxica, la que postula, que los niveles excesivos de glutamato endógeno o la hipersensibilidad de sus receptores se relacionan con la degeneración neuronal (45).

El término excitotoxicidad se refiere al mecanismo que promueve la muerte celular mediante la sobre-activación de receptores glutamatérgicos o de cualquiera de sus análogos. La excitotoxicidad provoca la entrada excesiva de calcio (Ca^{2+}) a la célula donde una parte es secuestrado por la mitocondria provocando un incremento del Ca^{2+} mitocondrial que conduce a la disfunción metabólica, la producción de radicales libres, activación de proteasas, fosfolipasas, de la óxido nítrico sintasa y las endonucleasas, así como la inhibición de la síntesis de proteínas. Una vía de daño celular directo sería por medio de la activación de la óxido nítrico sintasa que genera óxido nítrico y este reacciona con el superóxido formando peroxinitrito, mientras que otra vía sería la activación de la ribosa-poli-ADP polimerasa producida como respuesta al daño del DNA mediado por los radicales libres (Figura 1) (46, 65).

EXCITOTOXICIDAD Y EPILEPSIA

Estudios de microdiálisis en humanos y modelos animales documentan acerca de la asociación entre actividad convulsiva prolongada y duración del estatus epiléptico con la elevación significativa del glutamato (69). De igual forma se conoce que la sobre-excitación de las neuronas por glutamato puede producir descargas epilépticas así como la aplicación directa de glutamato en la amígdala induce un efecto similar al *kindling* (42); mientras que el empleo de antagonistas del receptor AMPA retardan el desarrollo del *kindling* amigdalino en ratones (54).

Un estudio *in vitro* demostró que la activación de los receptores NMDA media la muerte celular durante el estatus epiléptico (15). Además, el uso de un antagonista de este receptor, el MK-801, previene la aparición de las crisis espontáneas en modelos animales (53). Por otro lado, se reporta la participación de los receptores kainato en la epileptogénesis, especialmente a la subunidad GluR6 como inductor de epilepsia (68).

En general, el daño neuronal excitotóxico en pacientes epilépticos es mediado, a nivel celular, por la entrada excesiva de Ca^{2+} en las células durante las convulsiones (34). Los niveles elevados de Ca^{2+} desatan una secuencia de eventos como es la activación de la óxido nítrico sintasa que interfiere con el metabolismo oxidativo, generando radicales libres y daño de la membrana neuronal, de igual forma se activan procaspasas y se culmina con la muerte neuronal ya sea por necrosis o por apoptosis.

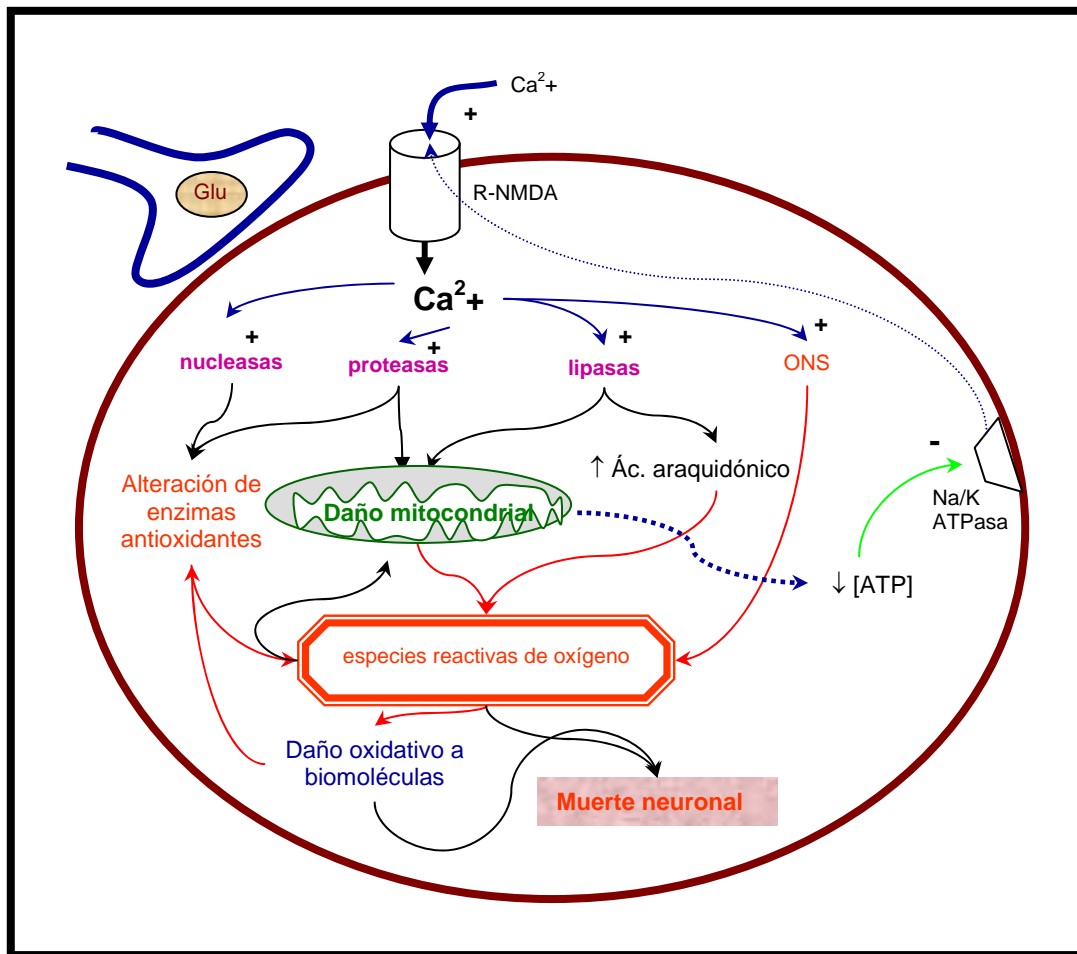


Figura 1. Mecanismos de excitotoxicidad. La entrada masiva de Ca^{2+} a la célula, a través del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) persistentemente activo, provoca la activación de enzimas líticas y de la óxido nítrico sintasa (ONS). El daño mitocondrial, es uno de los factores para el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno que conducen a la muerte neuronal producida por el daño a las biomoléculas y a la activación de programas de muerte apoptóticos. El déficit energético contribuye a la perpetuación del proceso degenerativo por favorecer la despolarización de la membrana y así mantener el estado activo del receptor NMDA. Esto hace sensible a la célula a la aferencia glutamatérgica normal procedente de la corteza cerebral.

EXCITOTOXICIDAD EN MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

Debido a las limitaciones naturales para poder estudiar la epilepsia, se han desarrollado modelos experimentales de epilepsia que asemejan a la epilepsia humana, sin embargo, la epilepsia humana y la experimental tienen diferencias considerables, como es el caso de la imposibilidad de evaluar satisfactoriamente las manifestaciones conductuales en los modelos experimentales de epilepsia, sobre todo, la conducta motora.

En general, los modelos experimentales de epilepsia se pueden clasificar como: agudos y crónicos, los modelos agudos se inducen por la aplicación de fármacos convulsionantes o por estimulación eléctrica, los modelos crónicos reproducen de mejor forma la fisiopatología de la epilepsia en humanos. Ambos tipos de modelos, agudos y crónicos, pueden producir crisis parciales o generalizadas. Sin embargo, debido a que la epilepsia se caracteriza por la recurrencia de manifestaciones ictales a lo largo del tiempo, solamente los modelos que reproducen esa condición, se consideran modelos de epilepsia. El último desafío en cualquier estudio experimental de la epilepsia es determinar cuál de los muchos cambios que ocurren en respuesta a un insulto en el cerebro está causalmente relacionados con el subsecuente desarrollo de la epilepsia.

Se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido por las crisis recurrentes contribuye de manera importante al daño y muerte celular, los radicales libres producidos por el estrés oxidativo son procesos integrales de la excitotoxicidad, esto ha sido soportado en parte por las observaciones de que las crisis prolongadas inducen daño celular a las macromoléculas; y se relaciona principalmente con la excitabilidad neuronal.

Dos tipos de insultos se han estudiado particularmente en los modelos animales: crisis febriles prolongadas (20 a 30 min) y el estatus epiléptico prolongado (5 a 8 h) inducido por la inyección sistémica de agonistas colinérgicos (pilocarpina) o de la inyección unilateral de agonistas glutamatérgicos en el hipocampo de rata (ácido kaínico).

Los modelos de crisis febriles, hipoxia neonatal y espasmos han demostrado que las neuronas en desarrollo son menos vulnerables en términos de daño neuronal y pérdida celular que las neuronas adultas sometidas a los mismos insultos. Por

ejemplo, las neuronas hipocampales pueden continuar respondiendo a estímulos sinápticos, en un ambiente totalmente anóxico se requieren largos períodos para destruir de manera irreversible los circuitos en animales inmaduros (13). El cerebro inmaduro parece ser también más resistente a los efectos tóxicos del glutamato que el cerebro maduro (64). Mark y colaboradores, demostraron que la cantidad de Ca^{2+} que entra a una neurona piramidal está directamente relacionada con la edad: entre el uno y los tres días de vida posnatal, el glutamato incrementa el Ca^{2+} mínimamente, en cambio en neuronas de 21 a 25 días posnatales se produce un marcado incremento en el Ca^{2+} intracelular e hinchazón y retracción de las dendritas al soma (41). Esta relativa resistencia se debe a la menor densidad de sinapsis activas, al bajo consumo de energía y en general a la relativa inmadurez de las cascadas bioquímicas que llevan a la muerte celular, por lo consiguiente, los animales jóvenes son menos vulnerables a la pérdida celular después de crisis prolongadas que los adultos (1, 5, 9)

En animales adultos, los modelos de excitotoxicidad más utilizados son el del ácido kaínico y la pilocarpina, también modelos de epilepsia del lóbulo temporal, que consisten en la inyección unilateral o sistémica de pilocarpina o ácido kaínico (análogo del glutamato) en dosis convulsionantes, las cuales también producen daño excitotóxico en las neuronas piramidales del hipocampo y en la región hilar. El daño depende de la dosis, de la especie y de la cepa de los animales, pero el resultado es la muerte de las neuronas en las regiones vulnerables, la proliferación de astrocitos y el aumento de fibras gliales. Por ese motivo, el paradigma de administración sistémica de ácido kaínico y pilocarpina se han considerado un buen modelo para el estudio de las convulsiones tónico clónicas generalizadas o estado epiléptico, cuyo sustrato neuroanatómico es la esclerosis temporal mesial (3, 4, 59, 62, 63). Uno de los primeros cambios después de la administración de ácido kaínico es la inducción de RNA mensajero y la expresión de la proteína de choque térmico HSP70/72 y HSP27, esta última se expresa constitutivamente en el cerebro de mamíferos, y es sobre-expresada en las poblaciones neuronales sensibles del hipocampo (2). La expresión de estas proteínas parece tener la función de prevenir el plegamiento anormal de proteínas nacientes en las poblaciones vulnerables al ácido kaínico. En los días siguientes a la administración y durante dos semanas, HSP27 y 70/72 se

transportan por el árbol dendrítico y a lo largo de los axones hacia las zonas más distales. HSP70/72 tiene un papel protector, aunque no consigue rescatar por sí misma a las células de la muerte excitotóxica. La sobre-expresión de HSP27 y 70 *in vivo* protege del daño excitotóxico (2, 71), mientras que niveles excesivamente altos de HSP72 pueden ser nocivos para las células (48, 49, 73).

Se ha observado que también se induce la sobre-expresión de cFos y cJun en las regiones vulnerables del hipocampo y en la circunvolución dentada después de tres a cinco horas de la inyección de ácido kaínico (51). La inmunorreactividad para cFos decrece a las seis horas en la circunvolución dentada, pero permanece alta en el hipocampo. Ello ha sugerido que la muerte celular puede asociarse a niveles altos de cFos, además se ha demostrado que el incremento prolongado de cFos no tiene un carácter predictivo y no se requiere para que se produzca daño neuronal excitotóxico (25,31). También se encuentra un aumento de la expresión de cJun en el hipocampo y en la circunvolución dentada 24 horas después de las crisis. El significado del aumento de cJun resulta contradictorio, ya que se ha señalado como marcador de muerte celular retardada secundaria a crisis epilépticas, o como un posible marcador de supervivencia neuronal frente a un daño excitotóxico (51).

Respecto a la señalización a través de la membrana celular, es interesante conocer que la serina proteasa extracelular, activador tisular del plasminógeno (tPA), parece ser necesaria para producir muerte celular, ya que ratones nulos para tPA o para plasminógeno son relativamente resistentes al daño excitotóxico. Este efecto parece mediado por la interacción de tPA con laminina, una proteína de la matriz extracelular (12). También relacionado con la señalización a través de la membrana celular se encuentra un aumento de la expresión de FasL, ligando específico del receptor Fas, en el hipocampo y en las células granulares de la circunvolución dentada tres horas después de la inyección de ácido kaínico (66). Mientras que en esta última región la expresión de FasL decrece seis horas después de la inyección de ácido kaínico, la inmunorreactividad para FasL se mantiene en el hipocampo. Este aspecto resulta relevante, ya que la unión de FasL y Fas activa el dominio de muerte de Fas, al que se une FADD, activando a su vez a caspasa 8. La activación de caspasa 8 actúa sobre las caspasas efectoras, quienes ejecutan la muerte por apoptosis. La

utilización de ratones transgénicos para Fas aporta datos sustanciales para conocer el papel del sistema Fas/FasL en la señalización de muerte celular excitotóxica.

El papel que desempeñan los miembros de la familia Bcl2 resulta todavía poco claro. Un estudio preliminar mostró reducción de proteína Bcl2 y aumento del RNA mensajero para Bax en el hipocampo del ratón después de la inyección sistémica de ácido kaínico (28). Estudios más precisos han encontrado, mediante *Northern blot*, una inducción del RNA mensajero de Bax –pero no de Bcl2 y Bclx– desde seis a 24 horas en el hipocampo de ratas inyectadas con ácido kaínico. La expresión de las proteínas Bcl2, Bclx y Bax en el hipocampo, analizada mediante *Western blot* e inmunohistoquímica, es parecida en las células destinadas a morir y en las células que sobreviven (38). Es posible que los efectos de los miembros de la familia Bcl2 no dependan de cambios globales de las proteínas, pero sí de su localización subcelular. La señalización de muerte apoptótica por la vía mitocondrial se desencadena por una unión de Bax a la membrana mitocondrial y por una liberación de citocromo c al citosol. Esta liberación comprende la unión a Apaf1 en presencia de ATP y la activación de la caspasa 9, quien, a su vez, activa distintas caspasas efectoras o ejecutoras. El modo en que se produce la salida de citocromo c de la mitocondria al citosol no está claro, pero parece establecerse una interacción entre Bcl2, Bclx y Bax, y los canales iónicos dependientes de voltaje que controlan la salida de citocromo c. Se ha propuesto que el balance entre Bax/Bcl2 en la célula es un factor crítico para determinar si una célula experimentará apoptosis (27).

La excitotoxicidad producida con ácido kaínico intraperitoneal también induce la expresión del RNA mensajero de la caspasa 3 y aumento de la expresión de procaspasa 3 en algunas neuronas de las regiones vulnerables del hipocampo (19, 20). Más aún, unas pocas neuronas expresan caspasa 3 activa (caspasa 3 hendida de 17 kDa) y activación de caspasa 3 (30). Esto indica la participación de la vía de caspasas en ciertas neuronas del hipocampo, lo que señala muerte celular con componente apoptótico en subpoblaciones del hipocampo. Sin embargo, los estudios con *Western blot* señalan la presencia de bandas de PARP de 89 kDa y también de bandas de menor tamaño, lo que indica que la fragmentación de PARP no se produce exclusivamente por activación de caspasas, sino también por actuación de otras proteasas, como predice la muerte indiscriminada por necrosis (20).

Como resultado del daño excitotóxico que afecta de manera preferencial a las células de la región hilar (32) las fibras musgosas procedentes de las células granulares de la circunvolución dentada se encuentran desconectadas de sus dianas. Esta diferenciación da lugar a la producción de ramificaciones axonales musgosas que progresan en la región supragranular y en toda la capa molecular de la circunvolución dentada (61, 67). Sin embargo, el recrecimiento de las fibras producido por las crisis convulsivas es menos evidente en animales jóvenes (6, 33). La formación de ramificaciones o *sprouting* se asocia con un incremento de la expresión de la proteína GAP43 en la capa supragranular durante la primera semana, y en toda la capa molecular a partir de un mes (7). Asimismo, se ha detectado aumentos en la expresión de la proteína asociada a los sinaptosomas de 25 kDa (SNAP25) en las neuronas y en la capa molecular de la circunvolución dentada, así como en las fibras musgosas del hipocampo en los días siguientes a la lesión excitotóxica por ácido kaínico (10,26). Parece probable la intervención de señales tróficas específicas en el desarrollo de estas conexiones aberrantes, aunque todavía resulta discutible el papel desempeñado por distintos factores tróficos. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el receptor TrkB en las neuronas de la circunvolución dentada apoyan una posible influencia sobre el trofismo de estas células en la construcción de ramificaciones plásticas dirigidas a reinervar zonas destruidas por el ácido kaínico. Por otro lado, se ha sugerido que el BDNF confiere protección por la atenuación del estrés oxidativo.

Las vías de señalización y el papel de la excitotoxicidad han sido estudiados exhaustivamente desde los años 70s. Sin embargo aún parece limitado el conocimiento de la excitotoxicidad en el sistema nervioso los mecanismos moleculares y los sitios de acción relacionados. En particular, el papel crítico de la muerte neuronal y los mecanismos que son potenciados con la sobre-activación de los receptores a glutamato, deben ser cuidadosamente evaluados, sobre todo, los relacionados con las enfermedades neurológicas con la finalidad de tener una intervención oportuna que permita retardar el desarrollo de patologías como la epilepsia (Figura 2).

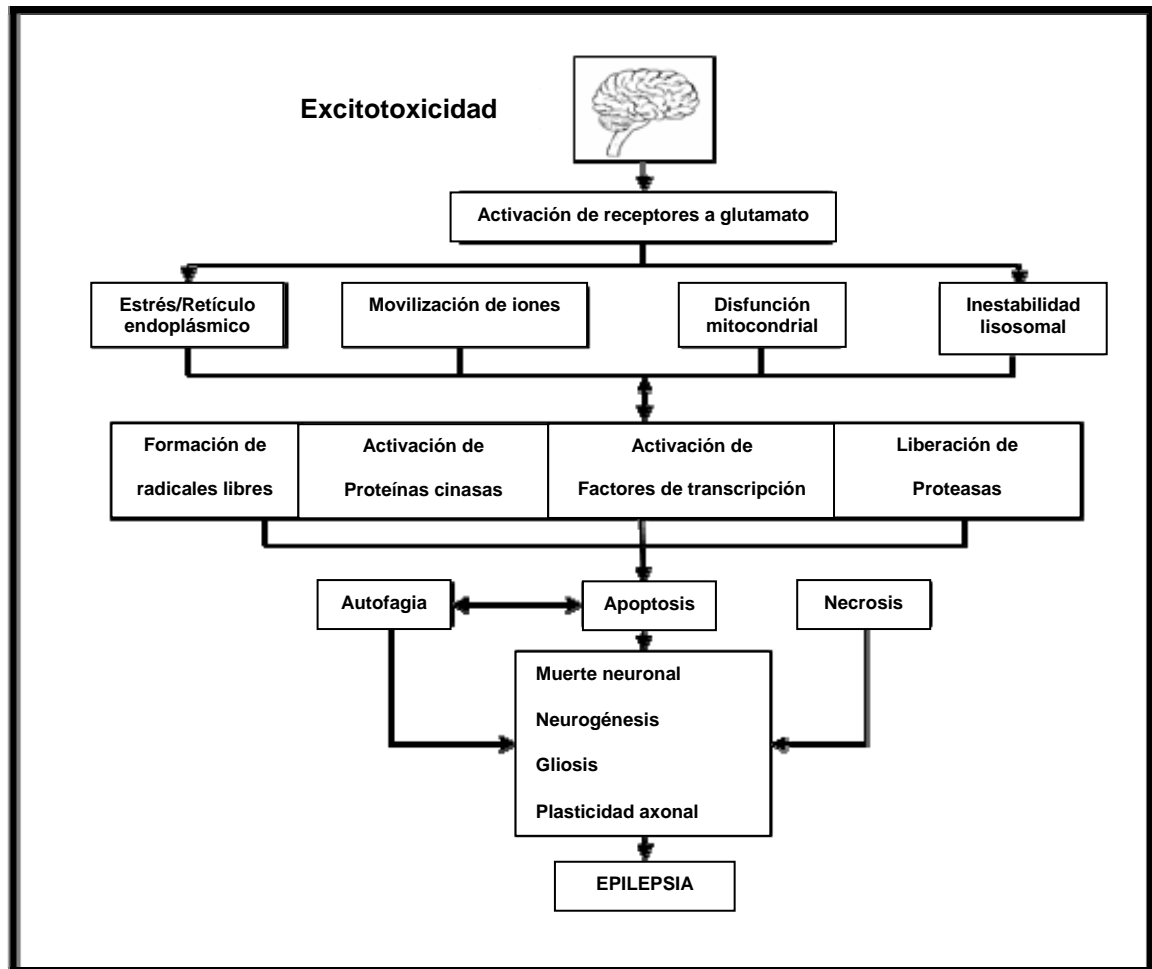


Figura 2. Mecanismos de excitotoxicidad en desórdenes neurológicos como la epilepsia. Modificado de Pitkanen, 2006 (47) y Wang, 2010 (72).

APOPTOSIS Y EPILEPSIA

El término de apoptosis describe una forma característica de muerte, gobernada por un programa genético común en varios tipos celulares. La apoptosis, usualmente afecta a células individuales, más que a todas las células de un tejido. Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células al inicio del proceso apoptótico, consiste en una condensación del citoplasma y reducción del volumen celular acompañado de cambios en la estructura del núcleo. La cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana; esto es seguido de invaginaciones de la membrana nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. De manera análoga, la membrana celular experimenta invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula formando racimos de vesículas de tamaño variable que contienen orgánulos intactos que no se fusionan con los lisosomas. A estas vesículas

se les denomina cuerpos apoptóticos, los cuales son rápidamente fagocitados por células vecinas. Por lo tanto, una de las consecuencias fisiológicas más relevantes de la muerte por apoptosis es que no se libera material intracelular al medio intersticial (18).

La muerte neuronal inducida por convulsiones no se exceptúa de la complejidad molecular de la muerte neuronal provocada por neurodegeneraciones y existe la gran controversia sobre si es una muerte celular apoptótica o necrótica. Basándose en la definición clásica y en los criterios morfológicos de la necrosis, esta se describe como el mecanismo más frecuente por el cual las células del cerebro mueren después de una convulsión (16, 22-24, 33, 36, 52). De esta forma diversos autores sustentan que la muerte neuronal inducida por un estatus epiléptico no es apoptótica sino necrótica y afirman que el mecanismo dominante por el cual una célula muere después de una crisis epiléptica es la necrosis (24, 70).

Sin embargo, estudios posteriores han demostrado la presencia de un componente apoptótico. Esta última afirmación se basa en varios hallazgos bioquímicos que establecen la participación en el proceso de muerte, después de convulsiones, de miembros de la familia del Bcl-2 y de las caspasas. Otros eventos que sustentan este hecho son: la detección de fragmentos múltiples de 180-200 pares de bases con activación temprana de endonucleasas y rotura del DNA, la fragmentación del DNA en las células destinadas a morir, originariamente descrito como indicador de apoptosis, la acumulación nuclear de p53 en neuronas vulnerables al ácido kaínico y la presencia aumentada de receptores de muerte y sus ligandos; todo lo cual, hace evidente la participación en este proceso de muerte de mecanismos apoptóticos (8, 17, 21, 29, 36, 44, 50, 57, 60)

Se han reportado alteraciones en la familia de proteínas Bcl-2 y en el clivaje de pro-caspasas 1 y 3 así como se han detectado varios marcadores de muerte celular apoptótica en diferentes modelos experimentales de epilepsia, las caspasas son activadas por convulsiones así como los receptores de muerte y las proteínas de la familia del Bcl-2 (11, 30, 44, 55, 60).

El p53 fue el primer elemento regulador de la apoptosis identificado como dañado por la actividad convulsiva (56). Se describe la sobrerregulación del p53 tanto de su RNA mensajero como de la proteína y esto se sustenta funcionalmente por los

siguientes hallazgos: a) la unión del DNA del p53 se produce después de las convulsiones (37), b) Bax está sobre-regulado por las convulsiones (28). Un inhibidor de la síntesis del p53 protege contra la excitotoxicidad producida por el ácido kaínico (14). Las neuronas de ratón deficientes de p53 son resistentes a las convulsiones y a la apoptosis inducida por excitotoxinas (43). No obstante, las consecuencias de las alteraciones descritas en el p53 en la muerte neuronal inducida por convulsiones aún no están esclarecidas del todo, debido fundamentalmente a las múltiples vías funcionales en las que el p53 participa. En general, los datos apuntan a que tanto las caspasas, como Bcl-2 y p53 juegan algún papel después de las convulsiones.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la división clásica entre apoptosis y necrosis ha sido discutida al definirse como dos procesos que pueden ocurrir independientemente, secuencialmente e incluso simultáneamente (60, 74); siendo en muchos casos definitorio el tipo de estímulo y su intensidad lo que determina si la célula muere por necrosis o por apoptosis. Se sugiere un modelo que habla de una continuidad entre la vía clásica de apoptosis mediada por caspasas y la necrosis o lisis celular (58). Los pasos intermedios que se plantean serían los siguientes: 1) la muerte celular programada similar a la apoptosis; 2) la muerte celular independiente de caspasas; y 3) la muerte celular programada similar a la necrosis. Este criterio es especialmente importante en el análisis de la muerte celular que ocurre en procesos neurológicos (35).

En general, la relación entre la muerte celular en modelos experimentales de epilepsia en los cuales es posible modular la duración e intensidad de las crisis, y la muerte celular en humanos epilépticos, permanece aún por establecer.

Datos de nuestro grupo de trabajo avalan la participación de ambos procesos de muerte celular, necrosis y apoptosis, en la pérdida neuronal observada en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. En dicho estudio, la inmunodetección de Annexina-V y TUNEL+ se elevó significativamente en el tejido neocortical de los pacientes en comparación con los controles (Figuras 3). Estos resultados apoyan la idea de que la muerte neuronal observada en esta área cerebral podría ser apoptótica, sin descartar la posibilidad de muerte necrótica ya que el marcaje TUNEL+ está asociado a ambos tipos de muerte. Valoramos también la posibilidad de la presencia

de una fase intermedia o de continuidad entre ambos tipos de muerte (40). Adicionalmente, describimos la presencia de un desbalance del sistema redox en este tipo de pacientes (39) que explicaría la muerte por disfunción mitocondrial causada por la despolarización de la membrana mitocondrial ocasionando la subsiguiente muerte celular. En estudios más recientes, detectamos por microscopía electrónica (datos no publicados) la presencia en estos tejidos de células con características morfológicas asociadas, tanto al proceso de muerte necrótica como apoptótica (Figura 4).

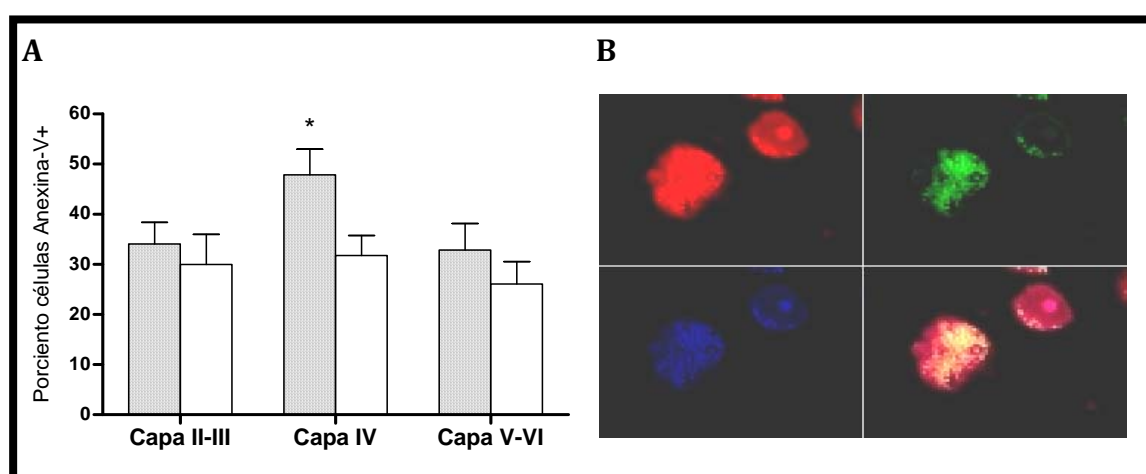


Figura 3. A. Comparación entre el porcentaje de células inmunorreactivas a la Anexina-V en diferentes capas de neocorteza de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (barra rosa) y el grupo control (barra azul). El porcentaje de células Anexina-V+ se calculó en relación con el total de células teñidas con yoduro de propidio por milímetro cúbico visualizadas por doble tinción y microscopía confocal (prueba Mann-Whitney $**p \leq 0.01$). **B.** Imagen confocal de neocorteza de un paciente con epilepsia del lóbulo temporal que ilustra la inmunodetección de células TUNEL+ (verde) doblemente marcadas con sinaptofisina (azul) y contrateñidas con yoduro de propidio (rojo).

Finalmente, como se puede apreciar, existen divergencias en los hallazgos de los diferentes grupos de investigación en esta temática, relacionadas fundamentalmente con la diversidad de modelos experimentales utilizados y la imposibilidad de reproducir fielmente todos los rasgos de la enfermedad, mientras que en el caso de los estudios en humanos, los mismos se han realizado en diferentes localizaciones del foco epileptogénico, del tiempo de evolución de las crisis, del tipo de crisis, de la edad de inicio de las crisis, entre otros aspectos. Todo esto sustenta la necesidad de realizar nuevos estudios que permitan caracterizar completamente la participación de los diferentes marcadores apoptóticos en los procesos convulsivos, para

establecer una vía de interacción con los mismos, que permita atenuar el daño ocasionado en esta entidad clínica.

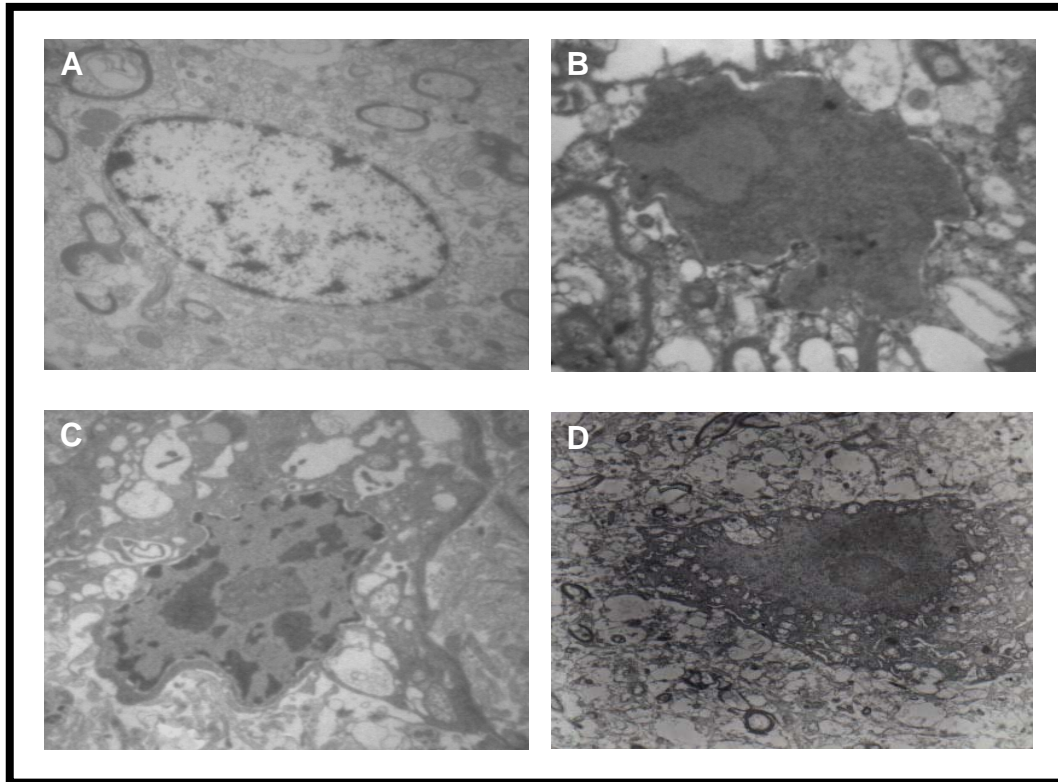


Figura 4. A: Neurona normal. B: Neurona en proceso de muerte necrótica. C y D: Neuronas en proceso de muerte apoptótica.

REFERENCIAS

1. Albala B, Moshe S, Okada R. Kainic acid-induced seizures: a developmental study. *Brain Res* 1984; 315(1):139-148.
2. Anguelova E, Smirnova T. Differential expression of small heat shock protein 27 in the rat hippocampus and septum after fimbria-fornix lesion. *Neurosci Lett* 2000; 280:99-102.
3. BenAri Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline and penicillin: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1981; 6:1361-1391.
4. BenAri Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985; 14:375-403.
5. Bender R, Baram TZ. Do prolonged febrile seizures injure hippocampal neurons? Insights from animal models. En: Baram TZ, Shinnar S. eds. *Febrile seizures*. San Diego, Academic Press. 2002 pp.583-587.
6. Bender R, Dubé C, Baram TZ. Mossy fiber sprouting into the inner molecular layer of the dentate gyrus follows prolonged febrile seizures in immature rat model. *Epilepsia* 2000; 41(suppl.7):76-79.
7. Bendotti C, Pende M, Samanin R. Expression of GAP43 in the granule cells of rat hippocampus after seizure induced sprouting of mossy fiber: in situ hybridization and immunocytochemical studies. *Eur J Neurosci* 1994; 6:509-515.

8. Bengzon J, Mohapel P, Ekdahl CT, Lindvall O. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. *Prog Brain Res* 2002; 135:111-119.
9. Berg M, Tremblay E, Nitecka L, Ben-Ari Y. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II Histopathological sequelae. *Neuroscience* 1984; 13 (4):1095-1104.
10. Boschert U, O'Shaughnessy C, Dickinson R, Tessari M, Bendotti C, Catsicas S. Developmental and plasticity related differential expression of two SNAP25 isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 1996; 367:177-193.
11. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995; 7:61-64.
12. Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin catalyzed degradation of laminin. *Cell* 1997; 91:917-25.
13. Cherubini E. Anoxia produces smaller changes in synaptic transmission, membrane potential and input resistance in immature rat hippocampus. *J Neurophysiol* 1989; 62(4):882-895.
14. Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, Greig NH, Mattson MP. A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid B-peptide. *J Neurochem* 2001; 77:220-228.
15. Deshpande LS, Lou JK, Mian A, Balir RE, Sombati S, Attkinson E, DeLorenzo RJ. Time course and mechanism of hippocampal neuronal death in an in vitro model of status epilepticus: Roles of NMDA receptor activation and NMDA dependent calcium entry. *Eur J Pharmacol* 2008; 583:73-83.
16. Ebert U, Brandt C, Loscher W. Delayed sclerosis, neuroprotection, and limbic epileptogenesis after status epilepticus in the rat. *Epilepsia* 2002; 43: 86-95.
17. Ekdahl CT, Mohapel P, Elmer E, Lindvall O. Caspase inhibitors increase short-term survival of progenitor-cell progeny in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus. *Eur. J Neurosci* 2001; 14:937-945.
18. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicology Pathologic* 2007; 35:495-516.
19. Faherty CJ, Xanthoudakis S, Smeyne RJ. Caspase3 dependent Neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Mol Brain Res* 1999; 70:159-163.
20. Ferrer I, López E, Blanco R, Rivera R, Krupinski J, Martí E. Differential cFos and caspase expression following kainic acid excitotoxicity. *Acta Neuropathol* 2000; 99:245-256.
21. Filipkowski R, Hetman M, Kaminska B, Kaczmarek KL. DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *Neuroreport* 1994; 5:1538-1540.
22. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Kainic acid induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience* 2000a; 98:4153.
23. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Seizure induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia* 2000b; 41:913-923
24. Fujikawa DG, Shinmei SS, Zhao S, Aviles ER. Caspase-dependent programmed cell death pathways are not activated in generalized seizure-induced neuronal death. *Brain Res* 2007; 1135:206-218.
25. Gass P, Herdegen T. Neuronal expression of AP1 proteins in excitotoxic neurodegenerative disorders and following nerve fiber lesions. *Progr Neurobiol* 1995; 47:257-290.
26. Geddes JW, Hess EJ, Hart RA, Kesslak JP, Cotman CW, Wilson MC. Lesions of hippocampal circuitry define synaptosomal associated protein25 (SNAP25) as a novel presynaptic marker. *Neuroscience* 1990; 38:515-525
27. Guillardon F, Klimaschewski L, Wickert H, Krajewski S, Reed JC. Expression pattern of candidate cell death effector proteins Bax, Bcl-2, Bcl-X, and c-Jun in sensory and motor neurons following sciatic nerve transection in the rat. *Brain Res* 1996; 739:244-250.
28. Guillardon F, Wichert H, Zimmermann M. Upregulation of Bax and downregulation of Bcl2 is associated with kainate-induced apoptosis in mouse brain. *Neurosci Lett* 1995; 192:85-88.
29. Henshall DC, Araki T, Schindler CK, Lan JQ, Tiekoter KL, Taki W, Simon RP. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. *J Neurosci* 2002; 22:8458-8465.
30. Henshall DC, Chen J, Simon RP. Involvement of caspase-3-like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. *J Neurochem* 2000; 74:1215-1223.
31. Kasof GM, Mandelzys A, Maika SD, Hamer RE, Curran T, Morgan JJ. Kainic acid induced neuronal death is associated with DNA damage and a unique immediate early gene response in cFos lacZ transgenic rats. *J Neurosci* 1995; 15:4238- 4249.

32. Kienzler F, Norwood BA, Sloviter RS. Hippocampal injury, atrophy, synaptic reorganization, and epileptogenesis after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in the mouse. *J Comp Neurol* 2009; 515(2):181-96.
33. Kubova H, Druga R, Lukasiuk K, Suchomelova L, Haugvicova R, Jirmanova I, Pitkanen A. Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. *J Neurosci* 2001; 21:3593-3599.
34. Lado FA, Laureta SL, Moshé. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. *Epileptic Disorders* 2002; 4:83-97.
35. Lee JM. Neuronal cell death in nervous system development, disease and injury. *Int J Mol Med* 2001; 7:455-478.
36. Liou AK, Clark RS, Henshall DC, Yin XM, Chen J. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol* 2003; 69:103-142.
37. Liu H, Cao Y, Basbaum AL, Mazarati AM, Sankar R, Wasterlain CG. Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12096-12101.
38. López E, Pozas E, Rivera R, Ferrer I. Bcl2, Bax and Bclx expression following kainic acid administration at convulsant doses in the rat. *Neuroscience* 1999; 91 146170.
39. López J, González M, Lorigados L, Morales L, Riverón G, Bauzá Y. Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy. *Clin Biochem* 2007; 40: 292-298.
40. Lorigados L, S Orozco, L Morales, I García, B Estupiñán, JE Bender, B Paula, L Rocha. Muerte neuronal en la neocorteza de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a fármacos. *Neurología* 2008; 23:555-565.
41. Marks J, Friedman J, Haddad G. Vulnerability of CA1 neurons to glutamate is developmentally regulated. *Brain Res Dev Brain* 1996; 97 (2): 194-206
42. Morimoto K, Fahnstock M, Racine R. Kinling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in Neurobiol* 2004; 73:1-60.
43. Morrison RS, Wenzel HJ, Kinoshita Y, Robbins CA, Donehower LA, Schwartzkroin PA. Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. *J Neurosci* 1996; 16:1337-1345.
44. Narkilahti S, Nissinen J, Pitkanen A. Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: effect on neuronal damage and epileptogenesis. *Neuropharmacol* 2003; 44:1068-1088.
45. Olney JW. Excitatory transmitters and epilepsy related brain damage. *Int Rev Neurobiol* 1985; 27:337-362.
46. Olney JW. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neuro Toxicology* 2003; 23:659-668.
47. Pitkanen A. Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis. Animal data. *Neurology* 2002; 59(Suppl 5):S26-S33.
48. Planas AM, Soriano MA, Estrada A, Sanz O, Martín F, Ferrer I. The heat shock protein response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. *Progr Neurobiol* 1997; 51:607-636.
49. Planas AM, Soriano MA, Ferrer I, Rodríguez Farré.ER. KA induced heat shock protein70, mRNA and protein expression is inhibited by MK801 in certain rat brain regions. *Eur J Neurosci* 1995; 7:293304.
50. Pollard H, Charriaut Marlangue, C, Cantagrel S, Represa A, Robain O, Moreau J. Kainate induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* 1994; 6:7-18.
51. Pozas E, Ballabriga J, Planas AM, Ferrer I. Kainic acid induced excitotoxicity is associated with a complex cFos and cJun response which does not preclude either cell death or survival. *J Neurobiol* 1997; 33:232-246.
52. Puig B, Ferrer I. Caspase-3-associated apoptotic cell death in excitotoxic necrosis of the entorhinal cortex following intraperitoneal injection of kainic acid in the rat. *Neurosci Lett* 2002; 321:182-186.
53. Rice C, DeLorenzo J. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. *Brain Res* 1998; 782:240-247.
54. Rogawski A, Kurzman S, Yamaguchi I, Li H. Role of AMPA and GluR5 kainate receptor in the development and expression of amygdala kindling in the mouse. *Neuropharmacol* 2001; 40:28-35.

55. Roy M, Hom JJ, Sapolsky RM. HSV-mediated delivery of virally derived anti-apoptotic genes protects the rat hippocampus from damage following excitotoxicity, but not metabolic disruption. *Gene Ther* 2002; 9:214-219.
56. Sakhi S, Bruce A, Sun N, Tocco G, Baudry M, Schreiber SS. p53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:7525-7529.
57. Sakhi S, Sun N, Wing LL, Mehta P, Schreiber SS. Nuclear accumulation of p53 protein following kainic acid induced seizures. *Neuroreport* 1996; 7:493-496.
58. Schmechel DE. Apoptosis in neurodegenerative disorders. In: Hannum, Y. A., Boustany, R. M. (Eds.), *Apoptosis in neurobiology*. CRC Press, Washintong DC, 1999, pp. 23-48.
59. Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 1980; 5:991-1014.
60. Sloviter R, Dean E, Sollas AL, Goodman JH. Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 1996; 366:516-533.
61. Sloviter RS, Zappone CA, Harvey BD, Frotscher M. Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus inhibitory interneurons: possible anatomical substrate of granule cell hyperinhibition in chronically epileptic rats. *J Comp Neurol* 2006; 494:944-960.
62. Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *C R Biol.* 2005; 328:143-153.
63. Sperk G, Lassmann H, Baran H, Seitelberger F, Honykiewicz O. Kainic acid induced seizures: doserelationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes. *Brain Res* 1985; 338:289-295.
64. Stafstrom CE, Holmes GL. Effects of uncontrolled seizures. Neuronal changes in animal models. *Adv. Exp. Med Biol* 2002; 497:171-194.
65. Struzynska L. A glutamatergic component of lead toxicology in adult brain: the role of astrocytic glutamate transporters. *Neurochemistry International* 2009; 55:151-156.
66. Tan Z, Levid J, Schreiber SS. Increased expression of Fas (CD95/ APO1) in adult rat brain after kainateinduced seizures. *Neuro Report* 2001; 12:1979-1982.
67. Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in the hippocampal formation of kainic acid treated rats. *J Neurosci* 1985; 5:1016-1022.
68. Telfeian E, Federoff J, Leone P, During J, Williamson A. Over expression of GluR6 in rat hippocampus produces seizure and spontaneous nonsynaptic bursting in vitro. *Neurobiol Disease* 2000; 7:362-374.
69. Ueda Y, Yokoyana H, Nakajima A, Tokumaru J, Doi T, Mitsuyama Y. Glutamate excess and free radical formation during and following kainic acid-induced status epilepticus. *Exp Brain Res* 2002; 147:219-226.
70. Uysal H, Cevik IU, Soylemezoglu F, Elibol B, Ozdemir YG, Evrenkaya TI. Is the cell death in mesial temporal sclerosis apoptotic? *Epilepsia* 2003; 44:778-784.
71. Valentim LM, Geyer AB, Tavares A, Cimarosti H, Worm PV. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunoccontent and phosphorylation in rat hippocampus. *Neuroscience* 2001; 107:43-49.
72. Wang Y, Qin Y. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*. 2010, Marzo (on line).
73. Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* 1998; 44: 584-591.
74. Zeiss, CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 2003; 40:481-495.

7

IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE LOS INOSITOL TRIFOSFATO EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

¹Vázquez de la Torre A, ²Auladell C, ¹Papagianni A, ¹Verdaguer E.

¹Unidad de Farmacología y Farmacognosia. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona, CIBERNED. Y ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso se constituye de una población heterogénea de neuronas, las cuales pueden diferir en varios aspectos como es su morfología, el patrón de actividad eléctrica, el tipo de neurotransmisor, receptor y segundos mensajeros que utilizan para comunicarse entre ellas. El sistema nervioso además, controla una gran cantidad de funciones mediante la comunicación intracelular que ejercen las neuronas a través de neurotransmisores y segundos mensajeros. Alteraciones en las vías de transmisión de las neuronas pueden provocar un daño neuronal. Cambios permanentes en las neuronas producidos por mensajeros químicos extracelulares se han asociado a alteraciones en la memoria y el aprendizaje. El mensajero extracelular se une a los receptores de la membrana celular, los cuales se unirán a proteínas y transferirán la señal del mensajero extracelular al interior de la célula. Los segundos mensajeros son la respuesta de la interacción del mensajero extracelular con un receptor de membrana. Esta interacción provoca la activación de determinadas enzimas las cuales catalizarán la síntesis de los segundos mensajeros. Existen pocos sistemas de segundos mensajeros acoplados a receptores, los más conocidos son el sistema de adenilato ciclasa, que como segundo mensajero utiliza el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), el sistema de guanilato ciclasa, cuyo segundo mensajero es el guanósín monofosfato cíclico (GMPc) y por último, y actualmente de

gran interés, es el mediado por la fosfolipasa C, la cual está asociada al metabolismo del fosfatidilinositol (1).

El fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados son componentes de las membranas plasmáticas de todas las células eucariotas. El interés en el metabolismo de este fosfolípido de membrana surgió en 1975, cuando Robert Michell observó que aquellos mensajeros que aumentaban el metabolismo del fosfatidilinositol, también elevaban la concentración de calcio intracelular. El ión calcio controla un amplio repertorio de acontecimientos en el sistema nervioso, incluyendo la liberación de neurotransmisores y secreción de vesículas, activación de enzimas, transcripción de genes, y también participa en mecanismos de citotoxicidad como excitotoxicidad, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de calpaínas y apoptosis, entre otras vías implicadas en la muerte neuronal.

El fosfatidilinositol es metabolizado por cinasas de la membrana que añaden grupos fosfato en las posiciones 4 y 5 del anillo del inositol generando fosfatidil inositol 4-fosfato y el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂). Este último, mediante la fosfodiesterasa fosfolipasa C, es hidrolizado dando lugar a diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃).

El IP₃ provoca la liberación de calcio almacenado en el retículo endoplásmico (2). Este efecto es rápido y de corta duración. Tras la escisión de PIP₂, el IP₃ es desfosforilado en las sucesivas posiciones 5, 4, 1 del inositol, generándose el inositol 1,4-bifosfato, el inositol 1-fosfato y el inositol libre, el cual podrá acoplarse con ácido fosfático para generar nuevamente PIP₂. La función del IP₃ consiste en controlar las reservas de calcio intracelulares. El IP₃ se une al receptor de trifosfato de inositol (IP₃R) que está acoplado a proteínas G provocando un incremento de la concentración de calcio intracelular.

El IP₃R se forma en el interior de la célula por la activación de del receptor acoplado a proteína G de siete transmembranas (7TM) o por receptores tirosina cinasas (RTKs), consecuentemente, la proteína G activará PIP₂ que a través de la fosfolipasa C dará lugar a la formación de DAG y IP₃. Así pues, el IP₃ movilizará el calcio de las reservas intracelulares activando los procesos dependientes de calcio. Una vez que el calcio es liberado, deberá capturarse en el retículo endoplásmico a través de la ATPasa de calcio asociada al retículo sarcoplásmico (SERCA). En el caso que haya

una liberación masiva de calcio, éste puede ser capturado también por la mitocondria.

Una alteración en la vía de los inositoles puede afectar a la homeostasis del calcio alterando funciones del cerebro como el aprendizaje y la coordinación. Además, una disminución de las concentraciones de PIP2 causa neurodegeneración ya que éste es el precursor para la formación del IP3 (1).

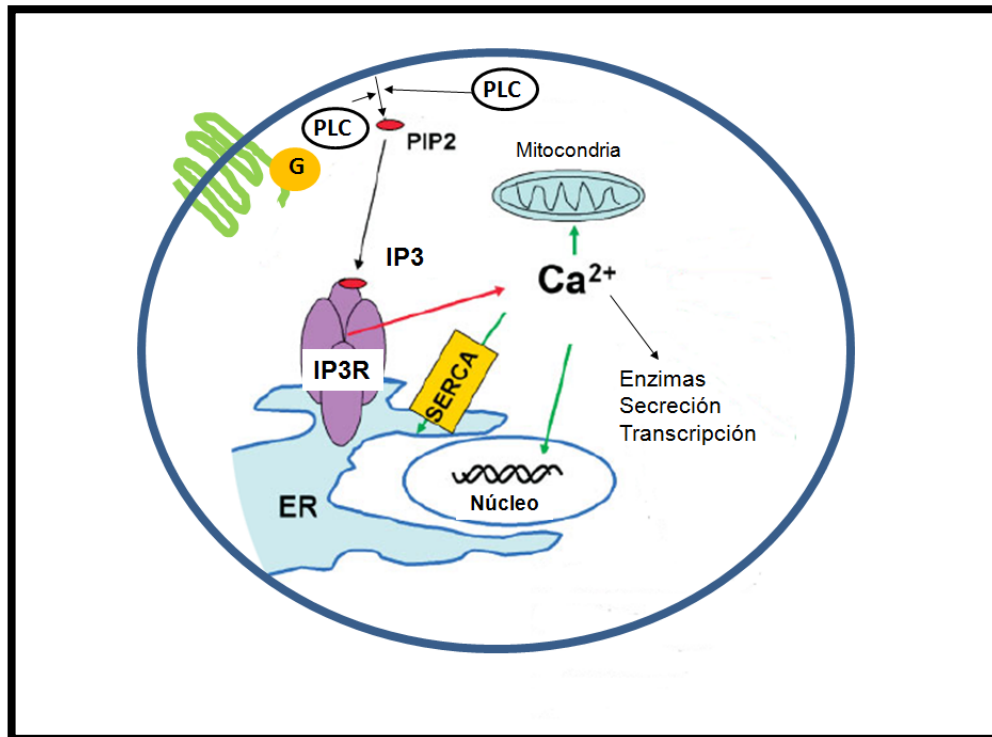


Figura 1. Representación esquemática de la vía de los inositoles (Adaptado de Banerjee et al., 2005).

PARTICIPACIÓN DE LOS INOSITOLES Y SUS RECEPTORES EN LA FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO

Comprender el papel fisiológico del IP3R en el sistema nervioso ha llevado a que numerosos estudios se centren en su localización, en tipos específicos de neuronas. El IP3R desempeña un papel importante en las funciones de desarrollo y también está implicado en la fisiología de la sinapsis y la plasticidad.

Los IP3R durante el desarrollo

Existen 3 isoformas distintas del receptor de IP3. El tipo 1 (1IP3R), se identificó hace una década en el cerebelo, siendo la isoforma neuronal predominante en vertebrados (13), difiere del tipo 3 (3IP3R) al tener un sitio de unión en la posición 4

del dominio N-terminal, el cual sirve de enlace para los filamentos de actina (12). La movilidad lateral del 1IP3R está restringida en el retículo endoplásmico de las neuronas hipocampales (12), mientras que el 3IP3R se ha reportado que es móvil en el retículo endoplásmico en células de ovario de hámster chino (11).

Como ya hemos comentado previamente, se han realizado estudios en los cuales se sugiere que el IP3R provoca la liberación del calcio que regula los cambios en la plasticidad y que son necesarios para el aprendizaje y la coordinación. La expresión del IP3R se detectó en células de Purkinje de cerebelo justo al nacer, ya que tanto los niveles de RNA mensajero de 1IP3R como los niveles de expresión de su proteína eran muy bajos en embriones de 17-18 días (E17-18). En el hipocampo, se observó un aumento de la expresión de 1IP3R entre E17 y P13 (postnatal 13) en la región CA1. Además, el aumento de la expresión del 1IP3R coincidió con los estadios de aumento de la sinaptogénesis y formación del contacto de las dendritas, que se refleja en un incremento de la formación de espinas durante este intervalo tiempo. Así pues, también se observó la expresión permanente de éste receptor tanto en la sustancia gris como en la blanca de la médula espinal durante el desarrollo (E12-14) y en el adulto, coincidiendo con el tiempo de diferenciación celular y axogénesis. Estos estudios demuestran que el IP3R tiene un papel importante en la ramificación de dendritas y axones (31).

El IP3 además, se ha descrito que participa en la polarización neuronal y la formación axonal. Se observó que IP3 se acumula en las puntas de los procesos de crecimiento y puede ser inhibido por inhibidores de la PI3K (Inositol 3 fosfato cinasa). Estos inhibidores pueden retardar la elongación y la formación axonal en neuronas. Los resultados descritos sugieren que IP3 y PI3K están implicados en la especificación axonal, posiblemente por estimulación del crecimiento de la neurita y formación del axón (23).

Participación de los IP3R en la fisiología de la sinapsis y plasticidad

El IP3R se ha demostrado que modula la liberación de neurotransmisores ya que se encuentra en las capas sinápticas de la retina localizado en la terminal presináptica de células bipolares y en células amácrinas (27). Recientemente, en células ganglionares de retina se ha visto que el IP3R controla la frecuencia de corrientes espontáneas. Estudios hechos en *knock-outs* de 1IP3R demostraron que estos

animales presentaban severos ataques epilépticos, a los 7 días después del parto y muchos morían a los 25 días (22).

En el circuito neuronal de las células de Purkinje, la plasticidad se mide como *Long-Term Depression* (LTD), este circuito está implicado en el aprendizaje motor y la coordinación motora (4), cambios en la plasticidad sináptica son los responsables de los ataques de epilepsia antes descritos. En un estudio paralelo también se demostró la importancia de la liberación de calcio a través del IP3R localizado en las espinas dendríticas para la inducción del LTD. En las células de Purkinje, la liberación de calcio por el IP3R tiene lugar en respuesta a la activación del receptor metabotrópico del glutamato (mGluR5) seguido de la estimulación de las fibras paralelas que intervienen en el LTD. La formación de IP3 se ha demostrado que puede darse ya sea por la estimulación de las fibras paralelas, como por la activación de los receptores AMPA y los canales de calcio dependientes de voltaje, además del formado por la activación de los mGluR5 durante la activación de las células de Purkinje. Por lo que se propone que el IP3R podría mediar la conexión de la activación de la señal entre el mGluR5 y el receptor AMPA (25).

Al estudiar las funciones celulares del IP3R en las neuronas del hipocampo, en este caso, se vio que la liberación de calcio mediado por el IP3R se debía a la estimulación de los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR), en las dendritas apicales de neuronas piramidales del hipocampo y así se amplificaba la señal inicial de calcio que tiene lugar por los canales de calcio dependientes de voltaje y por los receptores del NMDA. La amplificación de la producción del IP3, también se consigue si la estimulación muscarínica ocurre con la activación de los receptores AMPA y por consiguiente el calcio entrará directamente a través de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Así pues, los cambios que tienen lugar en el LTD en neuronas hipocámpales afectan a la correlación celular del aprendizaje y la memoria y son dependientes de la transcripción de genes estimulada por calcio (20, 3).

En la modulación del calcio y formación de IP3 cabe destacar la cinasa 3-fosfatidil inositol (PI3K). Viard y colaboradores (32) demostraron que PI3K provocaba un aumento de la expresión de los canales de calcio funcionales de la membrana plasmática y su regulación ocurría para canales de calcio asociados a la subunidad

específica $Ca\beta_2$. Además demostraron que la regulación de los canales de calcio inducida por la IP3K podía ser un mecanismo general para la regulación de la entrada de calcio en células excitables (32).

LOS INOSITOLES Y LA CINASA 3-FOSFATIDILINOSITOL (PI3K)

PI3K es una cinasa que fosforila a los inositoles en la posición del anillo del inositol, dando lugar a la formación de fosfoinositol, inositol bifosfato (PIP2) e inositol 3-fosfato (IP3). Esta cinasa está formada por dos subunidades una reguladora (p85) y otra catalítica (p110). Su doble actividad enzimática (cinasa de lípidos y proteínas), así como la capacidad de esta enzima para activar un gran número de señales de proteínas, conlleva a que tenga un papel importante en la regulación de las funciones celulares como el crecimiento y supervivencia, envejecimiento y transformación maligna. La activación de PI3K ocurre al ser fosforilada en un residuo de tirosina (Tyr) mediante la activación de receptores (plaquetario, insulina-like o el EGFR; receptor del factor del crecimiento epidermal) o por cinasas de tirosina.

Esta cinasa regula el control de la división celular y la apoptosis. Entre los principales efectores de PI3K cabe mencionar la proteína cinasa C (PKC), cinasas dependientes de fosfoinositoles, proteínas G, proteínas activadas por mitógenos (MAP), las cuales están activadas tanto por la interacción con los productos lipídicos de PI3K, como a través de proteínas de fosforilación dependientes de PI3K. El efecto antiapoptótico tiene lugar por la activación de otras vías de señalización como la proteína cinasa B (PKB/Akt) y/o enzimas dependientes de PKB (destacando GSK3: *Glycogen sintasa kinase-3*, cinasa implicada en varias enfermedades neurodegenerativas). La estimulación de la vía PI3K/PKB provoca un retraso de la apoptosis e incrementa la supervivencia celular y reorganización de la actina del citoesqueleto (19). Estudios de los mecanismos de control de la PI3K demostraron una nueva familia de proteínas cinasas de serina y treonina, las cinasas dependientes de fosfoinositoles (PDK), las cuales están activadas por los productos lipídicos de la PI3K y son también las responsables de la fosforilación y activación de numerosas proteínas cinasas de señalización, dónde se incluye tanto la vía de la PKB/Akt como la vía de la PKC.

Varios experimentos han demostrado que la activación de PKB/Akt por la formación del complejo entre esta enzima y los productos lipídicos de PI3K es clave para el efecto antiapoptótico de PI3K. La función de supervivencia y los efectos antiapoptóticos de PI3K, vienen mediados en neuronas por la activación de la vía de PKB/Akt. Es necesario la translocación a la membrana plasmática y la fosforilación en treonina 308 (Thr308) y serina 473 (Ser473), para que PKB/Akt se active (28). En neuronas, PKB/Akt es responsable de la supervivencia, pero en cambio, no controla el crecimiento ni la diferenciación celular. PKB/Akt inhibe la apoptosis inactivando por fosforilación a los mediadores pro-apoptóticos como Bad, GSK3, p53 y activando los anti-apoptóticos entre ellos Bcl-2, Bcl-xl, mTOR (7). La activación de PKB/Akt puede ser regulada negativamente por diferentes fosfatasa que transformarán el IP3 en PIP2, controlando así, el tiempo de activación de PKB/Akt. La fosfatasa más conocida es la proteína supresora de tumores PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (10).

Ya que PKB/Akt juega un papel importante en la supervivencia celular es de interés el estudio de las dianas por encima y por debajo de ella, con el fin de sintetizar nuevos fármacos que ayuden a la prevención de la muerte celular o a mantener la supervivencia. En los últimos años se han identificado un gran número de sustratos para PKB/Akt que actúan como mediadores de la supervivencia celular, además de las proteínas anti-apoptóticas, también puede inhibir por fosforilación a proteínas proapoptóticas como FOXO, que al ser fosforilado por PKB/Akt no puede desplazarse al núcleo impidiendo así la transcripción de genes pro-apoptóticos (6, 21). Algunos de los sustratos antiapoptóticos activados por PKB/Akt, los cuales también están implicados en la supervivencia celular, son la proteína CREB, que puede intervenir en la promoción de la plasticidad sináptica y la proteína IKK (*I_kB kinase*) responsable de la activación de NF_κB, un factor de transcripción implicado también en la supervivencia celular.

PKB/Akt, además de activar de una forma directa la supervivencia celular, también puede hacerlo de forma indirecta al unirse a la proteína adaptadora JIP1, impidiendo así, la unión con JNK (*Jun-N-terminal Kinase*)(16), proteína implicada en vías de muerte celular, y facilitar la activación de PKB/Akt mediante PDK1 (17), consiguiendo de esta forma mantener inactiva a JNK.

En la vía de supervivencia de PKB/Akt, Dudek y colaboradores (9, 10) demostraron que IGF-1 (insulin growth factor 1) era el responsable de la supervivencia en neuronas granulares de cerebelo deprivadas de suero o factores de crecimiento, directamente dependiente de la actividad PI3K e implicando a PKB/Akt. Estos estudios sugieren que PKB/Akt ocupa un lugar fundamental en la vía de supervivencia neuronal mediada por IGF-1 y su importancia en patologías del cerebro en el daño inducido por hipoxia/isquemia y alteraciones neurodegenerativas (5, 9, 10).

INOSITOLES TRIFOSFATO EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Enfermedad de Alzheimer (EA)

La estimulación del metabolismo de los inositoles en el cerebro se produce por un gran número de neurotransmisores. Entre ellos, la acetilcolina a través de la interacción con receptores muscarínicos provoca la activación del metabolismo de los inositoles. En algunas neuronas, se produce una despolarización lenta y de larga duración al activarse los receptores muscarínicos por acetilcolina, sugiriendo que ésta podría aumentar la excitabilidad neuronal a través de segundos mensajeros que estimularían la PKC. Algunas regiones del cerebro como la corteza cerebral, el hipocampo y el caudo-putamen poseen una alta inervación colinérgica, además de presentar un gran número de receptores muscarínicos. La importancia de la acetilcolina en estas zonas podría ser el mantenimiento del estado de excitabilidad basal cuya importancia radica en la función de la integración de la información. Así pues, en la EA, la pérdida de las funciones cognitivas está asociada a la pérdida de inervación colinérgica en la corteza cerebral.

La EA es un desorden neurodegenerativo caracterizado por una pérdida progresiva de neuronas corticales. A parte de la reducción o pérdida de la inervación colinérgica, la alteración de la homeostasis del calcio también es un factor importante en los cambios neuronales relacionados con la EA. La enfermedad familiar de Alzheimer está relacionada con mutaciones en dos de los genes de Presenilina, PS1 y PS2. Los dos son proteínas de membrana localizadas en el retículo endoplásmico y son capaces de alterar la señalización del calcio intracelular. PS1 actúa rellenando las reservas de calcio intracelular, mientras que PS2 interactúa con

numerosas proteínas de unión al calcio en el retículo endoplásmico. Como ya se ha descrito, las neuronas corticales expresan el IP3R, así pues, SP1 estimula el 1IP3R y debido a las altas reservas de calcio en el lumen del retículo endoplasmático aumenta la liberación de calcio del retículo endoplásmico (30). Estos descubrimientos pueden explicar porque la función sináptica está tempranamente alterada en el proceso de la EA, además señala a los IP3R como una posible diana terapéutica (8).

Otras evidencias de que en la EA está implicada en la vía de los inositoles, es el hecho que la administración de inhibidores de la fosfatidilinositol cinasa como la wortmanina o LY294002, en animales transgénicos de un modelo de la EA (Tg2576), provocaban una reducción del 40-50% de las placas seniles, además de una disminución de las formas peptídicas A β 40 y A β 42 (14). La wortmanina provocaba una reducción de la acumulación extracelular de A β *in vitro* y además, también la reducción de las placas seniles en animales *in vivo*.

Enfermedad de Huntington (EH)

La EH es un desorden neurodegenerativo progresivo que cursa con alteraciones del movimiento, cognición, personalidad y del humor. Es en el estriado dónde hay una pérdida más marcada en las neuronas espinosas medianas. La causa de la EH es la ampliación del extremo aminoterminal de poliglutamina de la huntingtina, esto provoca la desregulación de la homeostasis del calcio en las neuronas espinosas medianas a través de dos procesos que se detallan a continuación. La huntingtina mutada puede modular la expresión de las subunidades NR1A y NR2B del receptor de NMDA que se expresan en las neuronas espinosas medianas (33). Más recientemente se descubrió un segundo proceso por el cual se producía un aumento en la liberación del calcio por la asociación de la huntingtina con los 1IP3R. Este proceso se debe a la capacidad de la huntingtina para desensibilizar a los 1IP3R y estimular la actividad del receptor NMDA. Las neuronas espinosas medianas pueden compensar la entrada de calcio incrementando la recaptura mitocondrial de éste, pero cuando la capacidad mitocondrial no es suficiente para recapturar el calcio en exceso, se libera citocromo-c al espacio citoplasmático provocando la activación de caspasas y consecuentemente la muerte neuronal (15). En estudios *in vitro* se demostró que el bloque del 1IP3R con 2-APB y enozaparina (heparina de

bajo peso molecular), protege a las neuronas espinosas medias de la apoptosis inducida por glutamato (26).

Ataxia espinocerebelosa tipo 1

La ataxia espinocerebelosa tipo 1 se caracteriza por presentar una ataxia de la marcha y alteraciones como anomalías motoras oculares, síntomas piramidales y extrapiramidales, neuropatía periférica y déficits cognitivos. Las alteraciones neurológicas se deben principalmente a la pérdida progresiva de neuronas de cerebelo, aunque también degenera el tronco cerebral y los núcleos mesencefálicos y en algunos casos se presenta desmielinización en las columnas posteriores y los tractos espinocerebelosos.

La ataxia espinocerebelosa tipo 1 se caracteriza por una agregación nuclear causada por la expansión del aminoácido de glutamina en la proteína ataxina, principalmente en neuronas del cerebelo. Funcionalmente, parece ser que son los cambios a nivel nuclear más que los agregados, los que desencadenan la neuropatología y alteraciones del comportamiento (29). Un estudio de los genes alterados en la ataxia espinocerebelosa tipo 1, en un modelo de ratón para esta enfermedad, demostró que de los seis genes que estaban regulados a la baja, cuatro de ellos estaban relacionados con la vía de los inositoles, a destacar los genes para el 1PI3R y la 5 fosfatasa de inositol tipo1. Los cambios de estos genes se produjeron antes de la aparición de los cambios patológicos o de los síntomas de comportamiento, sugiriendo que en la enfermedad de la ataxia espinocerebelosa la desregulación del calcio juega un papel importante (18).

Envejecimiento

El envejecimiento es un gran factor de riesgo en las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Actualmente varios estudios han demostrado que la PI3K participa en el control del envejecimiento celular. Análisis comparativos de inhibidores de la PI3K demostraron que el LY2940002, un inhibidor de PI3K, era capaz de retardar el crecimiento celular. Además, PI3K podría controlar los procesos apoptóticos que tienen lugar en el envejecimiento celular, así como los procesos de autofagia. La regulación de la biogénesis del autofagosoma, la maduración y fusión con los lisosomas es un proceso complicado, en éste, varias vías y procesos de señalización están implicados. Algunas de estas vías son las de mTOR,

PI3K/PKB, Akt/PTEN, entre otras. Además cabe destacar que una de las principales dianas de la vía de los inositoles, PKB/Akt, tiene un papel fundamental en la supervivencia neuronal. Nie y colaboradores (24) demostraron la importancia de la vía de PKB/Akt en ratones de senescencia acelerada (SAMP10). Durante el envejecimiento se mantiene estable tanto el RNA mensajero como la expresión de PKB/Akt, pero en cambio, a los 6 meses de edad en ratones envejecidos, disminuye la expresión de Akt fosforilada en serina 473 (fosforilación necesaria para que Akt sea plenamente activa). Los ratones SAMP10 a los 6 meses ya presentan un obvio deterioro de las funciones de aprendizaje y memoria. Estos resultados sugieren una relación entre la pérdida de Akt fosforilada en serina 473 y la pérdida en aprendizaje y memoria. Estos resultados confirman, junto a otros, que en el envejecimiento están implicadas una gran variedad de vías, pero la vía de PKB/Akt es una de sus dianas claves.

Trastornos bipolares (enfermedad maníaco depresiva)

En los trastornos bipolares, aunque no se caractericen por ser una enfermedad neurodegenerativa, la vía de los inositoles tiene un papel importante. En la enfermedad maníaco depresiva hay evidencias de que en la fase maníaca se produce un incremento de la transmisión noradrenérgica en el sistema nervioso central. Efecto que produciría un aumento en la formación de IP3 acentuando el aumento de la concentración intracelular de calcio, ya que algunos efectos centrales de la noradrenalina están mediados por la activación de receptores adrenérgicos acoplados a la fosfolipasa C, enzima responsable de transformar el PIP2 en DAG e IP3. De hecho, el efecto terapéutico del litio para esta enfermedad se debe a que inhibe a la fosfatasa que fosforila en la posición 1 del inositol, evitando así la formación de PIP2 en la membrana plasmática y consecuentemente disminuyendo la de IP3 y DAG.

Además, una disminución de los receptores de IP3 provoca un empeoramiento de la inducción de LTD en las neuronas del cerebelo, sugiriendo que los cambios en la plasticidad sináptica son la causa fundamental de los fenómenos de ataxia y los ataques epilépticos (22).

Dado el extenso número de procesos en los cuales pueden participar los inositoles, y su implicación en el mantenimiento de la homeostasis del calcio en el cerebro,

podrían en un futuro ser posibles dianas terapéuticas. Así, actualmente, se desarrollan nuevos fármacos que puedan controlar o inhibir la activación de IP3 o de su receptor en condiciones patológicas.

REFERENCIAS

1. Banerjee S and Hasan G. The InoP_3 receptor: its role in neuronal physiology and neurodegeneration. *BioEssays*.2005. 27(1035-1047).
2. Berridge MJ & Irvine RF. Inositol triphosphate, a novel second Messenger in cellular signal transduction. *Nature*. 1984.312 (315-321).
3. Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron*.1998.21:13-26.
4. Boyden ES, Katoh A, Raymond JL. Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Annu Rev Neurosci*. 2004.27:581-609.
5. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001.26(11):657-64. Review.
6. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999 Mar 19;96(6):857-68.
7. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*. 2001. 11(3):297-305. Review.
8. Cheung HK, L. Mei, D. D. Mak, I. Hayashi, T. Iwatsubo, D. E. Kang, J. K. Foskett, Gain-of-function enhancement of IP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. *Sci.Signal*.3, ra22 (2010).
9. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-41.
10. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997;275(5300):661-5.
11. Ferreri-Jacobia M, Mak DO, Foskett JK. Translational mobility of the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca^{2+} release channel in endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*. 2005. 280:3824-3831.
12. Fukatsu K, Bannai H, Zhang S, Nakamura H, Inoue T, et al. Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is regulated by actin filaments and 4.1N in neuronal dendrites. *J Biol Chem*. 2004.279:48976-48982
13. Furuichi T, Simon-Chazottes D, Fujino I, Yamada N, Hasegawa M, et al. Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptortype 1 gene (*Insp3r1*) in the mouse central nervous system. *ReceptorsChannels*.1993. 1:11-24.
14. Haugabook SJ, Le T, Yager D, Zenk B, Healy BM, Eckman EA, Prada C, Younkin L, Murphy P, Pinnix I, Onstead L, Sambamurti K, Golde TE, Dickson D, Younkin SG, Eckman CB. Reduction of Abeta accumulation in the Tg2576 animal model of Alzheimer's disease after oral administration of the phosphatidyl-inositol kinase inhibitor wortmannin. *FASEB J*. 2001;15(1):16-18.
15. Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*. 1999;23(1):181-92.
16. Kim AH, Yano H, Cho H, Meyer D, Monks B, Margolis B, Birnbaum MJ, Chao MV. Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron*. 2002;35(4):697-709.
17. Kim AH, Sasaki T, Chao MV. JNK-interacting protein 1 promotes Akt1 activation. *J Biol Chem*. 2003;278(32):29830-6.
18. Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, et al. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 1998;95:41-53.
19. Krasilnikov MA. 2000. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry*. 65 (1):59-66.

20. Li W, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY. Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 1998;392:936-941
21. Linseman DA, Phelps RA, Bouchard RJ, Le SS, Laessig TA, McClure ML, Heidenreich KA. Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 2002;22(21):9287-97.
22. Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, et al. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature* 1996;379:168-171.
23. Ménager C, Arimura N, Fukata Y and Kaibuchi K.. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J. Neurochem.* 2004;89: 109-118.
24. Nie K, Yu JC, Fu Y, Cheng HY, Chen FY, Qu Y, Han JX. Age-related decrease in constructive activation of Akt/PKB in SAMP10 hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(1):103-7.
25. Okubo Y, Kakizawa S, Hirose K, Iino M. Cross talk between metabotropic and ionotropic glutamate receptor-mediated signaling in parallel fiber-induced inositol 1,4,5-trisphosphate production in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci.* 2004. 24:9513-9520.
26. Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci.* 2002; 5(8):731-6.
27. Peng YW, Sharp AH, Snyder SH, Yau KW. Localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in synaptic terminals in the vertebrate retina. *Neuron* 1991;6:525-531.
28. Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol.* 2002;22(17):6247-60.
29. Skinner PJ, Koshy BT, Cummings CJ, Klement IA, Helin K, et al. Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature* 1997;389:971-974.
30. Stutzmann GE, Caccamo A, LaFerla FM, Parker I. Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability. *J Neurosci.* 2004;24(2):508-13.
31. Takei K, Shin RM, Inoue T, Kato K, Mikoshiba K. Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in growth cones. *Science* 1998. 282:1705-1708.
32. Viard P, Butcher AJ, Halet G, Davies A, Nürnberg B, Hebllich F, Dolphin AC. PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nature Neurosc.* 2004;7(9):939-946.
33. Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron.* 2002;33(6):849-60.

8

DETERIORO COGNOSCITIVO Y NEUROPLASTICIDAD TRAS LA EXCITOTOXICIDAD MEDIADA POR GLUTAMATO

González-Burgos I, Beas-Zárate C, Velázquez-Zamora DA.

División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS; y
Depto. de Biol. Cel. y Mol., CUCBA, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

INTRODUCCIÓN

En la década de 1970, se demostró que el glutamato cumplía la mayor parte de los criterios para ser considerado como un neurotransmisor en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos. Por ejemplo, se demostró la presencia de receptores de glutamato en las membranas de las neuronas (Evans et al., 1979), su liberación de terminales nerviosas mediada por actividad excitadora (Hamberger et al., 1979) y la presencia de sistemas de transporte específicos de alta afinidad (Logan y Snyder, 1972).

Además de su función neurotransmisora, el glutamato participa en procesos de crecimiento y maduración neuronal durante el desarrollo del Sistema Nervioso, en la formación y eliminación de sinapsis, así como en la estructuración de patrones de conectividad sináptica (Fox, 1996). Así mismo, está involucrado en los cambios en la eficiencia sináptica que se relacionan con la potenciación y depresión de larga duración, los cuales se consideran actualmente como el correlato celular de los procesos de aprendizaje y memoria (Morris et al., 1986). Ciertas alteraciones de la transmisión glutamatérgica están implicadas en el daño neuronal observado tras la ocurrencia de episodios de isquemia, así como en la etiología de diversos estados neuropatológicos (Salinska et al., 2005).

NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA Y EXCITOTOXICIDAD

La actividad neurotransmisora del glutamato ocurre en virtud de la activación de moléculas proteicas receptoras insertas en la membrana de la célula post-sináptica. Tales “receptores” son tanto de tipo ionotrópico como metabotrópico; esto es, receptores que se activan por la unión específica del transmisor y que se asocian a canales iónicos o bien, se acoplan a sistemas de segundos mensajeros y a través de proteínas G a nivel intracelular; respectivamente (Meldrum, 2000).

La excitación química rápida mediada por glutamato ocurre en el 90% de los receptores ionotrópicos. Estos son proteínas integrales formadas por cuatro subunidades polipépticas que se clasifican en tres tipos: el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropiónico (AMPA) y el kainato (KA) (Salinska et al., 2005). Los receptores NMDA son canales catiónicos que permiten el paso de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Poseen una alta permeabilidad a Ca^{2+} (Ascher y Nowak, 1988), en estado de reposo se encuentran bloqueados por concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} por lo que son dependientes de voltaje (Mayer y Westbrook, 1987; Nowak et al., 1984), presentan un tiempo de apertura largo (Nowak et al., 1984) y una cinética de activación y de desactivación relativamente lenta (Lester et al., 1990). Además, poseen varios sitios de regulación alostérica a diversos compuestos endógenos y exógenos (Lerma, 1992; Lerma et al., 1991). Los receptores AMPA poseen una farmacología menos compleja respecto a los NMDA (Ito et al., 1990) y participan -de manera coordinada con los NMDA- en la transmisión rápida y en fenómenos relacionados con la plasticidad sináptica (Fox, 1996). El receptor de kainato se expresa en dos sub-familias: una incluye a las subunidades GluR5, GluR6 y GluR7 y la otra que incluye a las subunidades KA1 y KA2. Los receptores de kainato se distribuyen ampliamente en todo el Sistema Nervioso Central, aunque los patrones de expresión de las distintas sub-unidades son bastante heterogéneos (Bahn et al., 1994), lo cual explica la dificultad para identificar o diseñar agonistas y antagonistas específicos. Lo anterior ha sido la razón del relativamente poco conocimiento que se tiene de estos receptores desde un punto de vista farmacológico (Huettner, 1990; Paternain et al., 1998; Sommer et al., 1992).

Los ocho diferentes subtipos de receptores metabotrópicos se han clasificado en tres grupos: el primero agrupa a los subtipos mGluR1 y mGluR5, que activa a una fosfolipasa C, en tanto que los miembros del segundo grupo, los mGluR2 y mGluR3, así como los del tercero (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8), están acoplados negativamente a adenilato ciclasa. Finalmente, el receptor mGluR6 está acoplado a la activación de GMPc fosfodiesterasa. En una sinapsis excitadora típica, los receptores ionotrópicos son más abundantes que los metabotrópicos y están fuertemente involucrados con la transmisión rápida de los impulsos, en tanto que los metabotrópicos regulan la actividad de los primeros y median los efectos lentos del glutamato (Dingledine y McBain, 1994), a lo que contribuye su localización en la periferia de las densidades post-sinápticas de las espinas dendríticas (Luján et al., 1996). En general, tanto los receptores ionotrópicos como los metabotrópicos han sido relacionados con la plasticidad sináptica tanto transitoria como de efectos más duraderos y, particularmente, con la inducción y mantenimiento de la potenciación de larga duración (LTP) (Bennett, 2000, Bortolotto et al., 2005), electrofisiológico de estimulación sináptica estrechamente relacionado con el aprendizaje y la memoria (Bliss y Lømo, 1973; Morris et al., 1986). Los receptores mGluR1 se localizan principalmente en los límites de la densidad post-sináptica, localización que favorece la modulación de la actividad de los receptores ionotrópicos AMPA y NMDA (Bessis et al., 2001) y, por ende, la excitabilidad de la neurona post-sináptica (Niswender y Conn, 2010). Por su parte, los mGluR2 y mGluR3 se localizan tanto pre- como post-sinápticamente, en tanto que los del tercer grupo de receptores metabotrópicos (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) se localizan pre-sinápticamente y actúan a manera de autoreceptores con actividad inhibitoria (Niswender y Conn, 2010).

El proceso de transmisión de información mediada por glutamato inicia con la transmisión de un potencial de acción excitador a la terminal axónica. La concentración de glutamato en una vesícula sináptica se aproxima a 100 mM y la liberación de su contenido genera un potencial post-sináptico excitador que corresponde principalmente a la activación de receptores de AMPA (Meldrum, 2000). Así, ante la liberación de glutamato por la terminal axónica la actividad de los receptores post-sinápticos generalmente inicia por la apertura del canal acoplado a

dicho receptor ionotrópico. Un alto porcentaje de los contactos sinápticos excitadores se llevan a cabo sobre espinas dendríticas. Estas poseen toda la maquinaria metabólica para procesar la información aferente, incluyendo los receptores de glutamato, al grado de ser consideradas como compartimentos cuasi-independientes de la dendrita progenitora, que regulan el flujo de información excitadora aferente (Koch et al., 1992). El receptor AMPA localizado en la superficie externa de la espina dendrítica es permeable al flujo recíproco e inverso de Na^+ y K^+ . La pequeña diferencia de potencial generada por este flujo de corriente iónica da lugar a las condiciones microambientales que favorecen la remoción del ión Mg^{2+} del interior del canal del receptor NMDA y su consecuente apertura, en virtud de ser sensible a voltaje. El receptor NMDA es así mismo permeable a Na^+ y K^+ de la misma manera que el AMPA y, adicionalmente, es permeable a iones Ca^{2+} (Bear et al., 1998). Bajo condiciones específicas, se activan secundariamente receptores metabotrópicos (Luján et al., 1996) que inducen la liberación de calcio del retículo endoplásmico liso –que constituye el llamado “aparato de la espina”- existente en el interior de las espinas grandes (Spacek y Harris, 1997), así como de los sistemas de amortiguamiento de Ca^{2+} (por ejemplo, calbindina) en las espinas más pequeñas (Ellisman et al., 1990). Este proceso es reversible, de manera que los sistemas involucrados en la liberación de Ca^{2+} son los mismos que lo “capturan” para evitar daño por incremento intracelular anormal en las concentraciones de dicho ión (Ellisman et al., 1990). Así, existe un sistema de regulación de la concentración de Ca^{2+} en el interior de la espina que protege naturalmente a la célula de posible daño excitotóxico mediado por la actividad neurotransmisora y por la elevación anormal de la concentración de Ca^{2+} , no solo en la espina sino en la dendrita progenitora (Kostyuk, 1998). Lo anterior está también favorecido por la presencia de bombas de Ca^{2+} en las espinas, las cuales participan en la extrusión de tales iones (Majeuska et al., 2000) con lo que se evita el incremento de su concentración en la dendrita progenitora durante su difusión hacia ella (Volfovsky et al., 1999).

El funcionamiento normal de la neurotransmisión excitadora depende del mantenimiento de la homeostasis neuronal basada en la regulación de la liberación controlada de glutamato de los depósitos vasculares a las terminales nerviosas pre-sinápticas, de su recaptura por la astrogliá circundante y de la sensibilidad de los

receptores. Por lo tanto, para evitar daño celular los reservorios metabólicos de glutamato deben mantenerse aislados de sus sitios receptores. Sin embargo, bajo condiciones patológicas el glutamato existente tanto en reservas metabólicas como vasculares puede ser liberado al espacio extracelular como resultado de hiperexcitación, daño celular o desbalance energético. Además, el daño neuronal excitotóxico puede ser el resultado de efectos tóxicos de agonistas exógenos de receptores de glutamato o de la disfunción de los receptores glutamatérgicos a partir de la composición aberrante de sus sub-unidades proteicas o bien, de alteraciones en el metabolismo de las neuronas (Salinska et al., 2005). La terminación de la actividad neurotransmisora del glutamato se caracteriza por la recaptura del transmisor del espacio intersináptico hacia la terminal pre-sináptica. Este proceso es mediado por proteínas transportadoras localizadas ya sea en la terminal pre-sináptica o en células gliales (Danblot, 2001) y depende de la producción de ATP. La alteración de la actividad de tales transportadores o la reversión de la direccionalidad del transporte de glutamato pueden ocasionar la retención de glutamato en la hendidura sináptica y con ello la generación de efectos neurotóxicos (Rothman, 1985). La estimulación sostenida de los receptores de glutamato conduce a la despolarización de la neurona y al influjo de Na^+ , Cl^- y agua a través de receptores AMPA y kainato, así como canales de Na^+ dependientes de voltaje, lo cual desencadena mecanismos subsecuentes de daño celular (Okiyama et al., 1997). Esta cadena de fenómenos es la responsable de la hinchazón celular (Kiedrowski et al., 1994). Por otra parte, la neurodegeneración provocada por la liberación masiva de glutamato es mediada principalmente por el influjo de Ca^{2+} a través del canal de los receptores NMDA (Dubinski y Rothman, 1991). Los receptores AMPA están involucrados indirectamente en este proceso, en virtud de que median la despolarización a partir de la desinhibición del canal NMDA y la remoción ulterior del Mg^{2+} . Esto trae por consecuencia una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular, distorsiones en la transducción de las señales bioeléctricas y, consecuentemente, la degeneración de la célula. A lo anterior se agrega el incremento secundario en la concentración de glutamato extracelular, lo cual prolonga y exacerba el efecto excitotóxico (Doble, 1999). De hecho, este efecto secundario se considera como el principal factor responsable de la propagación de la

zona de necrosis alrededor del foco isquémico en el accidente vascular cerebral (Benveniste et al., 1984).

TRANSMISIÓN SINÁPTICA EXCITADORA EN ESPINAS DENDRÍTICAS

Los contactos sinápticos excitadores ocurren mayoritariamente con espinas dendríticas. Las espinas son protrusiones citoplásmicas que se extienden perpendicularmente respecto al eje longitudinal de las dendritas, con una longitud de entre 0.1 y 2 μm (Harris and Stevens, 1989). Hasta la fecha se han descrito seis formas de espinas: delgadas, en forma de hongo, gordas, ramificadas, dobles y anchas (Harris et al., 1989; Tarello-Acuña et al., 2000). La densidad proporcional de los diferentes tipos de espinas es variable, aunque generalmente predominan las delgadas y las en forma de hongo; le siguen las gordas y, en una proporción mucho menor, las anchas y luego las ramificadas y las dobles (Lee et al., 2005; Tarello-Acuña et al., 2000). Tanto las espinas delgadas como las en hongo, las ramificadas y las dobles están formadas por dos subestructuras: el cuello y la cabeza. El cuello constituye la prolongación del citoplasma de la dendrita progenitora y es una estructura tubular de longitud variable que se amplía para formar la cabeza de la espina cuya forma es esferoidal y cuyo volumen es así mismo variable. Por otra parte, en las espinas gordas y anchas no existe distinción estructural entre la cabeza y el cuello.

En el borde inferior de la zona más apical de las espinas con o sin cabeza existe la llamada “densidad post-sináptica”, la cual está compuesta por filamentos de actina anclados a la membrana plasmática. La densidad post-sináptica contiene una amplia variedad de proteínas asociadas a dichos filamentos de actina, todas relacionadas tanto con la traducción de las señales químicas transmitidas por el neurotransmisor (glutamato) como con los eventos asociados con la plasticidad sináptica y los cambios estructurales en la geometría de la espina asociados a aquella. Se ha mostrado que la interacción entre tales grupos de proteínas sustenta la capacidad plástica de las espinas bajo condiciones tanto normales como patológicas (Cingolani y Goda, 2008; Sheng y Hoogenraad, 2007).

Tanto el tamaño como la forma de una espina –y particularmente la longitud y el diámetro del cuello- determinan la fuerza sináptica del impulso nervioso que reciba

(Korkotian y Segal, 2000; Wilson, 1984). Las espinas pueden expresar modificaciones estructurales en cuestión de minutos (Muller et al., 2000) y con ello la distribución de los receptores de glutamato también se modifica. Por ejemplo, si la cabeza de la espina crece en volumen, el área ocupada por receptores ionotrópicos también se expande con respecto al área ocupada por receptores metabotrópicos. Alternativamente, si la espina tiende a transformarse en espina en hongo, entonces la densidad de receptores metabotrópicos y el área que éstos ocupan aumentarían (Luján et al., 1996). Tanto los receptores ionotrópicos como los metabotrópicos están involucrados en la plasticidad transitoria (de corto plazo) como en la plasticidad más persistente (de largo plazo) (Bennett, 2000; Bortolotto et al., 2005). En este mismo sentido, se ha reportado que durante el desarrollo cerebral se reduce la proporción de espinas con capacidad para expresar transformaciones plásticas (Holtmaat et al., 2005). Se ha mostrado que este tipo de espinas “transitorias” son de tipo delgadas (Holtmaat et al., 2005), que por ser las más eficientes en la transmisión de impulsos sinápticos (Koch et al., 1992) permiten ajustes en el procesamiento de la información. Además, se ha reportado que las espinas en sujetos adultos son menos plásticas y por períodos más cortos en comparación con individuos más jóvenes (Grutzendler et al., 2002).

En condiciones normales, la concentración del ión Ca^{2+} es determinante para la activación de los procesos plásticos de transformación geométrica de las espinas (Koch y Zador, 1993; Kovalchuk et al., 2000). Un incremento moderado de Ca^{2+} dentro del rango normal causa el alargamiento de la espina, mientras que el incremento excesivo en su concentración causa su contracción o su desaparición (Segal et al., 2000). En concordancia con lo anterior, pulsos pequeños de estimulación mediada por glutamato alargan las espinas, mientras que pulsos de mayor magnitud las encogen o las hacen desaparecer (Korkotian and Segal, 1999). Además, estudios electrofisiológicos muestran así mismo que una estimulación débil produce incremento de espinas (Kirov y Harris, 1999), en tanto que una estimulación excesiva induce su retracción o desaparición (Jiang et al., 1998). Así, la actividad del Ca^{2+} en el interior de la espina estaría relacionada con los cambios plásticos que pueden presentarse bajo condiciones de actividad fisiológica normal, así como con aquellos cambios fisiopatológicos relacionados con la excitotoxicidad.

Existen diversos factores que influyen sobre la integración de la información que recibe una espina. Entre otros, su localización topográfica, su densidad, la proximidad entre ellas y su estructura geométrica permiten la transferencia de cargas eléctricas a espinas vecinas, por lo que pueden ser potenciadas diferencialmente (Sorra y Harris, 2000). Esta asociación entre estímulos sinápticos sobre espinas vecinas es determinante, por ejemplo, para la inducción del LTP (Harris y Kater, 1994).

BASES SINÁPTICAS DE LA COGNICIÓN

Las interconversiones geométricas de las espinas dependen de los eventos sinápticos y pueden ser expresados bajo diversas condiciones normales o psicopatológicas. De hecho, tales eventos dinámicos constituyen el sustrato morfofuncional que sustenta la capacidad plástica de las sinapsis subyacente a fenómenos como el aprendizaje y la memoria (González-Burgos et al., 2005; González-Burgos y Feria-Velasco, 2008; Kasai et al., 2003; Lee et al., 2005; Muller et al., 2000).

Las espinas dendríticas están directamente relacionadas con el LTP (Fifkova y Van Harreveld, 1977) y con la existencia de receptores AMPA de glutamato en la cabeza de las espinas; particularmente las pequeñas (Matsuzaki et al., 2004) y las silentes (aquellas que no son activas) (Geinisman, 2000) resultan críticas para su inducción. Se ha mostrado que la activación artificial de sinapsis silentes inducen la expresión de receptores AMPA (Isaac et al., 1995), lo que induce su potenciación (Muller et al., 2000) y sostenimiento, permitiendo la consolidación de la memoria (Lamprecht y LeDoux, 2004). Por otra parte, no es posible inducir LTP cuando las espinas son estimuladas a un nivel sub-umbral, si el Ca^{2+} es atrapado o si los receptores NMDA son bloqueados antagónicamente (Bennett, 2000). A este respecto se ha postulado que la activación secundaria de los receptores metabotrópicos produce un incremento de las corrientes iónicas mediado por la permeabilidad del canal acoplado al receptor NMDA, lo que facilitaría la inducción del LTP (Petrozzino y Connor, 1994). Con base en lo anterior, se ha propuesto que los receptores AMPA se relacionan con el incremento en la eficiencia sináptica, en tanto que la actividad de

los del tipo NMDA estarían involucrados en la detección de actividad coincidente (Muller et al., 2002).

Tras la inducción del LTP ocurren varios cambios en la morfofisiología de las espinas. La proporción de terminales axónicas que hacen sinapsis con dos o más espinas se incrementan (Toni et al., 2001), lo que contribuye a explicar el incremento en el número de sinapsis y en la complejidad de la citoarquitectura dendrítica que se observa tras el aprendizaje de una tarea dada (Kleim et al., 1997; Moser et al., 1994).

Tras pocas horas de inducción de LTP, ocurre neo-formación y recambio de espinas, esto es, la cabeza de algunas espinas pre-existentes se agrandan (Lang et al., 2004; Toni et al., 2001) lo cual depende de la activación de receptores tipo AMPA (Matsuzaki et al., 2004); permaneciendo estables por varios días (Harris et al., 2003; De Roo et al., 2008). Tales cambios podrían corresponder a la transformación de espinas delgadas en espinas en hongo. Aunque se ha sugerido que dicho agrandamiento en las espinas grandes es transitorio, aquellas que se transforman desde espinas delgadas son más persistentes (Matsuzaki, 2007; Matsuzaki et al., 2004). En cualquier caso, el agrandamiento de las espinas estaría limitado por un incremento en la conductancia del Ca^{2+} a través del cuello de la espina, lo cual es producido en forma autorregulada por el propio LTP (Matsuzaki, 2007). Más aún, se ha mostrado que el agrandamiento de la cabeza de la espina está asociado con un incremento en el número de ribosomas en el interior de la espina, (Harris et al., 2003) y el consecuente incremento en la síntesis de proteínas (Duffy et al., 1981), así como con el incremento prolongado en la liberación de glutamato (Dolphin et al., 1982) inducido por señales postsinápticas mediadas por ácido araquidónico (Bennett, 2000), lo cual favorecería el sostenimiento del LTP una vez inducido (Williams et al., 1989). En concordancia con lo anterior, se ha propuesto que el agrandamiento de la cabeza de la espina estaría más relacionado con la consolidación y sostenimiento del LTP que con su inducción inicial (Bennett, 2000; Lang et al., 2004; Yang et al., 2008). Más aún, el agrandamiento de la cabeza de la espina ocurrido tras la inducción de LTP puede producir la formación de sinapsis perforadas –densidades sinápticas irregulares en la cabeza de la espina- (Geinisman et al., 1993; Toni et al., 2001), las cuales, mediante la formación intermediaria de una

espinas ramificadas, ulteriormente se dividen para formar dos espinas independientes generalmente del tipo delgada (Moser et al., 1994; Muller et al., 2000). De hecho, se ha mostrado una relación estrecha entre la inducción de LTP, el aprendizaje espacial y una mayor incidencia de espinas ramificadas (Muller et al., 2000), concomitantemente con un incremento en la proporción de sinapsis perforadas con agrandamiento de la densidad postsináptica como producto del proceso de aprendizaje (Geinisman, 2000). Así, la inducción de LTP sobre espinas dendríticas produce efectos que pueden ser directamente relacionados con el aprendizaje de tareas específicas (Fedulov et al., 2007). Más específicamente, se ha sugerido que las espinas delgadas están más relacionadas con el proceso de aprendizaje, en tanto que las espinas en hongo lo están con el proceso de memoria (Bourne and Harris, 2007; Kasai et al., 2003; Matsuzaki et al., 2004). En este sentido, estudios realizados en el campo CA1 del hipocampo de ratas hembra mostraron una mayor proporción de espinas en hongo durante la etapa de proestro, mientras que en la etapa de estro se observó una mayor cantidad de espinas delgadas (González-Burgos et al., 2005). Existe evidencia de que la densidad de espinas dendríticas en neuronas del campo CA1 del hipocampo se incrementa como resultado de la formación de huellas mnésicas asociativas (Leuner et al., 2003) y aunque la densidad de todos los tipos de espinas es mayor en proestro (Woolley et al., 1990) -lo que le conferiría al sujeto una mayor capacidad para integrar información sináptica (Harris y Kater, 1994)- la adquisición de información espacial es menos eficiente en esta etapa del ciclo estral (Warren y Juraska, 1997). Así, la mayor eficiencia conductual reportada en la etapa de estro podría estar relacionada con la mayor proporción de espinas delgadas, en virtud de su mayor eficiencia sináptica (Koch y Zador, 1993) y, consecuentemente, de su mejor capacidad de integración de la información aferente relacionada con el aprendizaje de la tarea (Bourne y Harris, 2007; Kasai et al., 2003; Matsuzaki et al., 2004). Estos hallazgos representan un claro ejemplo de la forma en que la plasticidad sináptica mediada por espinas dendríticas puede modificar los patrones de desempeño cognoscitivo, en función del efecto modulador que pueden ejercer diversas moléculas que potencialmente afecten la transmisión excitadora mediada por el glutamato.

DETERIORO COGNOSCITIVO INDUCIDO POR EXCITOTOXICIDAD

Las espinas dendríticas traducen la información excitadora mediada por la neurotransmisión glutamatérgica mediante la activación de los receptores ionotrópicos del tipo NMDA (Genoux y Montgomery, 2007; Santini et al., 2001). Tal activación del receptor induce cambios en la actividad molecular del citoesqueleto de la espina dendrítica para producir las modificaciones plásticas de su estructura geométrica, lo cual influye ulteriormente sobre la eficiencia cognoscitiva (Barkus et al., 2010; Darrah et al., 2008). Entre otras proteínas asociadas al citoesqueleto de actina de la espina, la drebrina A está involucrada tanto en la regulación de la morfología de las espinas maduras como en su capacidad plástica (Kojima and Shirao, 2007). Se ha observado que el bloqueo antagónico del receptor NMDA afecta negativamente el desempeño de tareas de memoria tanto espacial (Ekstrom et al., 2001; Kentros et al., 1998; Larkin et al., 2008; McDonald et al., 2005) como no espacial (González-Burgos et al., en prensa) y que dicho efecto está sustentado parcialmente en variaciones tanto en la densidad de espinas dendríticas (González-Burgos et al., en prensa; Leuner et al., 2003; Medvedev et al., 2010) como en el contenido de drebrina A, a manera de mecanismo plástico de tipo compensador (González-Burgos et al., en prensa). Tales hallazgos son evidencia de que la actividad de los receptores de glutamato está directamente involucrada en la organización de la información excitadora aferente y que los mecanismos de señalización en el interior de las espinas dendríticas median los efectos plásticos que sustentan el desempeño en tareas conductuales específicas.

Al igual que el bloqueo antagónico de la neurotransmisión glutamatérgica mediada por el receptor NMDA, modificaciones en la conformación estereoquímica de las subunidades del mismo podría resultar en deterioro cognoscitivo. De hecho, la sobre-estimulación del sistema glutamatérgico mediada por la administración neonatal sistémica de glutamato monosódico (GMS) produce alteraciones en la transcripción de las subunidades proteicas NR1, NR2B y NR2C del receptor NMDA (Rivera-Cervantes et al., 2009) en el hipocampo de ratas adultas, concomitantemente a un desempeño deficiente en la resolución de tareas de memoria de referencia espacial (Olvera-Cortés et al., 2005), cualidad dependiente de actividad hipocampal (O'Keefe y Nadel, 1978). La despoblación parcial tanto de

células granulares del giro dentado como de neuronas piramidales en el campo CA1 concomitante a dichos eventos es evidencia de muerte neuronal como parte del fenómeno excitotóxico inducido y, por otro lado, las modificaciones en la citoarquitectura neuronal, así como en la densidad y forma de las espinas dendríticas, sugieren la ocurrencia de respuestas plásticas de tipo compensador ante los efectos tóxicos del glutamato, en el largo plazo (González-Burgos et al., 2009). Interesantemente, la administración experimental de GMS en la etapa adulta en dosis inductoras de crisis convulsivas produce reducción en la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales, pero no afecta la densidad proporcional de los diferentes tipos de espinas (González-Burgos et al., 2004), lo que sugiere la retracción homogénea de éstas tras la sobre-estimulación sináptica mediada por el glutamato (Jiang et al., 1998; Korkotian and Segal, 1999), mientras la proporción de cada tipo permanece estable quizás como una respuesta adaptativa (González-Burgos et al., 2004).

La oclusión del flujo sanguíneo al cerebro o a regiones circunscritas a éste (isquemia global o focal, respectivamente) también provoca alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y con ello excitotoxicidad y muerte neuronal (Benveniste et al., 1984). Estudios experimentales realizados por microdiálisis muestran que tras la inducción de isquemia ocurre un incremento de glutamato extracelular (Globus et al., 1988). De hecho, la liberación de glutamato es uno de los eventos más iniciales durante la isquemia y es activado por la despolarización de la membrana (Choi, 1988). Se ha reportado que los efectos a largo plazo inducidos por isquemia experimental incluyen un 25% de muerte de neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo, así como una incapacidad para resolver una tarea de memoria de referencia espacial en el laberinto de Morris (Letchipía-Vallejo et al., 2007). Adicionalmente, a pesar de una resolución efectiva de una tarea de memoria de trabajo espacial, ésta ocurrió con retraso (Letchipía-Vallejo et al., 2007), lo cual se vio reflejado en una hipotrofia neuronal y en una menor densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral prefrontal ventromedial (García-Chávez et al., 2008), región particularmente asociada con la organización de la memoria de trabajo espacial (Ball et al., 2009).

REFERENCIAS

1. Ascher, P., Nowak, L. (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J. Physiol.* 399:247-266.
2. Bahn, S., Volk, B., Wisden, W. (1994) Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.* 14:5525-5547.
3. Ball, K., Smith, D., Ellison, A., Schenk, T. (2009) Both egocentric and allocentric cues support spatial priming in visual search. *Neuropsychology.* 47:1585-1591.
4. Barkus, C., McHugh, S.B., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N., Bannerman, D.M. (2010) Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur. J. Pharmacol.* 626:49-56.
5. Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (1998) *Neurociencia. Explorando el cerebro.* Barcelona, MASSON-Williams & Wilkins.
6. Bennett, M.R. (2000) The concept of long-term potentiation of transmission at synapses. *Prog. Neurobiol.* 60:109-137.
7. Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., Diemer, N.H. (1984) Elevation of extracellular concentrations of glutamate in rat hippocampus during transient cerebral ischaemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43:1369-1374.
8. Bessis, A.S., Acher, F., Pin, J.P. (2001) Metabotropic glutamate receptor: exciting possibilities in excitatory transmission. *Cell transmissions.* 17:3-9.
9. Bliss, T.V., Lømo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232:331-356.
10. Bortolotto, Z.A., Collett, V.J., Conquet, F., Jia, Z., van der Putten, H., Collingridge, G.L. (2005) The regulation of hippocampal LTP by the molecular switch, a form of metaplasticity, requires mGlu5 receptors. *Neuropharmacology.* 49:13-25.
11. Bourne, J., Harris, K.M. (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17:1-6.
12. Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1:623-634.
13. Cingolani, L.A., Goda, Y. (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews.* 9:344-356.
14. Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65:1-105.
15. Darrach, J.M., Stefani, M.R., Moghaddam, B. (2008) Interaction of N-methyl-D-aspartate and group 5 metabotropic glutamate receptors on behavioral flexibility using a novel operant set-shift paradigm. *Behav. Pharmacol.* 19: 225-234.
16. De Roo, M., Klausner, P., Muller, D. (2008) LTP promotes a selective long-term stabilization and clustering of dendritic spines. *Plos Biol.* 6:1850-1860.
17. Dingledine, R., McBain, Ch.J. (1994) Excitatory amino acid transmitters. En G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers & P. B. Molinoff (Eds.), *Basic neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects.* 4th. Edition, New York, Raven press. pp. 367-387.
18. Doble, A. (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacol. Ther.* 18:163-221.
19. Dolphin, A.C., Errington, M.L., Bliss, T.V. (1982) Long-term potentiation of the perforant path in vivo is associated with increased glutamate release. *Nature.* 297:496-498.
20. Dubinsky, J.M., Rothman, S.M. (1991) Intracellular calcium concentration during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *J. Neurosci.* 11:2545-2551.
21. Duffy, C., Teyler, T.J., Shashoua, V.E. (1981) Long term potentiation in the hippocampal slice: evidence for stimulated secretion of newly synthesized proteins. *Science.* 212:1148-1151.
22. Ekstrom, A.D., Meltzer, J., McNaughton, B.L., Barnes, C.A. (2001) NMDA receptor antagonism blocks experience-dependent expansion of hippocampal "place fields". *Neuron.* 31:631-638.
23. Ellisman, M.H., Deering, T.J., Ouyang, Y., Beck, C.F., Tanksley, S.J., Walton, P.D., Airey, J.A., Sutko, J.L. (1990) Identification and localization of ryanodine binding proteins in the avian central nervous system. *Neuron.* 5:135-146.
24. Evans, R.H., Francis, A.A., Hunt, K., Oakes, D.J., Watkins, J.C. (1979) Antagonism of excitatory amino acid-induced responses and of synaptic excitation in the isolated spinal cord of the frog. *Br. J. Pharmacol.* 67: 591-603.

25. Fedulov, V., Rex, Ch.S., Simmons, D.A., Palmer, L., Gall, Ch.M., Lynch, G. (2007) Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. *J. Neurosci.* 27:8031-8039.
26. Fifkova, E., Van Harreveld, A. (1977) Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area. *J. Neurocytol.* 6:211-230.
27. Fox, K. (1996) The role of excitatory amino acid receptors in developmental plasticity of sensory neocortex. En F. Conti & Ph. Hicks (Eds.), *Excitatory amino acids and the cerebral cortex. USA*, MIT, pp. 229-244.
28. García-Chávez, D., González-Burgos, I., Letechipía-Vallejo, G., López-Loeza, E., Morali, G., Cervantes, M. (2008) Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neurosci. Lett.* 448:148-152.
29. Geinisman, Y. (2000) Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioural learning. *Cereb. Cortex.* 10:952-962.
30. Geinisman, Y., de Toledo-Morrell, L., Morrell, F., Heller, R.E., Rossi, M., Parshall, R.F. (1993) Structural synaptic correlate of long-term potentiation: formation of axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones. *Hippocampus.* 3:435-446.
31. Genoux, D., Montgomery, J.M. (2007) Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34:1058-1063.
32. Globus, M.Y.T, Busto, R., Dietrich, W.D., Martinez, E., Valdes, I., Ginsberg, M.D. (1988) Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and β -aminobutyric acid studied in intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 51:1455-1464.
33. González-Burgos, I., Alejandre-Gómez, M., Cervantes, M. (2005) Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci. Lett.* 379:52-54.
34. González-Burgos, I., Fera-Velasco, A. (2008) Serotonin/Dopamine interaction in memory formation. En L. A. Esposito, V. Di Mateo & G. Di Giovanni (Eds.), *Serotonin-dopamine interaction: experimental evidence and therapeutic relevance. Progress in Brain Research Series. Vol. 172* Holland, Elsevier, pp. 603-623.
35. González-Burgos, I., González-Ramírez, M.M., Velázquez-Zamora, D.A., Beas-Zárate, C. NMDA receptor blockade leads to impaired egocentric working memory and plastic changes in prefrontal dendritic spines, in adult rats. *Neurosci. Res.* En prensa.
36. González-Burgos, I., López-Vázquez, M.A., Beas-Zárate, C. (2004) Density, but not shape, of hippocampal dendritic spines varies after a seizure-inducing acute dose of monosodium glutamate in rats. *Neurosci. Lett.* 363:22-24.
37. González-Burgos, I., Velázquez-Zamora, D.A., Beas-Zárate, C. (2009) Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate excitotoxicity. *Int. J. Devl. Neurosci.* 27:741-745
38. Grutzendler, J., Kasthuri, N., Gan, W.B. (2002) Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature.* 420:812-816.
39. Hamberger, A., Hedquist, B., Nyström, B. (1979) Ammonium ion inhibition of evoked release of endogenous glutamate from hippocampal slices. *J. Neurochem.* 33(6):1295-1302.
40. Harris, K.M., Fiala, J.C., Ostroff, L. (2003) Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 358:745-748.
41. Harris, K.M., Jensen, F.E., Tsao, B.H. (1989) Ultrastructure, development, and plasticity of dendritic spine synapses in area CA1 of the rat hippocampus: extending our vision with serial electron microscopy and three-dimensional analyses. En V. Chan-Palay & Ch. Kohler (Eds.), *The hippocampus - new vistas USA*, Alan R. Liss. pp. 33-52.
42. Harris, K.M., Kater, S.B. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:341-371.
43. Harris, K.M., Stevens, J.K. (1989) Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.* 9:2982-2997.
44. Holtmaat, A.J.G.D., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G.W., Svoboda, K. (2005) Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron.* 45:279-291.
45. Huettnner, J.E. (1990) Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by Con A. *Neuron.* 5:255-66.

46. Isaac, J.T.R., Nicoli, R.A., Malenka, R.C. (1995) Evidence for silent synapses : implications for the expression of LTP. *Neuron*. 15:427-434.
47. Ito, I., Tanabe, Kohda, S.A., Sugiyama H. (1990) Allosteric potentiation of quisqualate receptors by a nootropic drug aniracetam. *J. Physiol*. 424:533-543.
48. Jiang, M., Lee, C.L., Smith, K.L., Swann, J.W. (1998) Spine loss and other persistent alterations of hippocampal pyramidal cell dendrites in a model of early-onset-epilepsy. *J. Neurosci*. 18:8356-8368.
49. Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H. (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*. 26:360-368.
50. Kentros, C., Hargreaves, E., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Shapiro, M., Muller, R.V. (1998) Abolition of long-term stability of new hippocampal place cell maps by NMDA receptor blockade. *Science*. 280:2121-2126.
51. Kiedrowski, L., Brooker, G., Costa, E., Wroblewski, J.T. (1994) Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron*. 12:295-300.
52. Kirov, S.A., Harris, K.M. (1999) Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated. *Nat. Neurosci*. 2:878-883.
53. Kleim, J.A., Vij, K., Ballard, D.H., Greenough, W.T. (1997) Learning-dependent synaptic modifications in the cerebellar cortex of the adult rat persists for at least four weeks. *J. Neurosci*. 17:717-721.
54. Koch, Ch., Zador, A. (1993) Dendritic spines: convergence of theory and experiment. *Science*. 13:413-422.
55. Koch, Ch., Zador, A., Brown, T.H. (1992) Dendritic spines: convergence of theory and experiment. *Science*. 256:973-974.
56. Kojima, N., Shirao, T. (2007) Synaptic dysfunction and disruption of postsynaptic drebrin-actin complex: A study of neurological disorders accompanied by cognitive deficits. *Neurosci. Res*. 58:1-5.
57. Korkotian, E., Segal, M. (1999) Bidirectional regulation of dendritic spine dimensions by glutamate receptors. *Neuroreport*. 10:2875-2877.
58. Korkotian, E., Segal, M. (2000) Structure-function relations in dendritic spines: is size important? *Hippocampus*. 10:587-595.
59. Kostyuk P. (1998) Plasticity in nerve cell function. New York: Oxford University Press.
60. Kovalchuk, Y., Eilers, J., Lisman, J., Konnerth, A. (2000) NMDA receptor-mediated subthreshold Ca(2+) signals in spines of hippocampal neurons. *J. Neurosci*. 20:1791-1799.
61. Lamprecht, R. and LeDoux, J. (2004) Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci*. 5:45-54.
62. Lang, C., Barco, A., Zablow, L., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., Zakharenko, S.S. (2004) Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101:16665-16670.
63. Larkin, A.E., Fahey, B., Gobbo, O., Callahan, C.K., Cahill, E., O'Mara, S.M., Kelly, A.M. (2008) Blockade of NMDA receptors pre-training, but not posttraining impairs object displacement learning in the rat. *Brain Res*. 1199:126-132.
64. Lee, K.J., Kim, H., Rhyu, I.J. (2005) The roles of dendritic spine shapes in Purkinje cells. *The Cerebellum*. 4:97-104.
65. Lerma J. (1992) Spermine regulates N-methyl-D-aspartate receptor desensitization. *Neuron*. 8:343-52.
66. Lerma, J., Zukin, R.S., Bennett, M.V. (1991) Interaction of Mg²⁺ and phencyclidine in use-dependent block of NMDA channels. *Neurosci. Lett*. 123:187-91.
67. Lester, R.A., Clements, J.D., Westbrook, G.L., Jahr, C.E. (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature*. 346:565-567.
68. Letechipía-Vallejo, G., López-Loeza, E., Espinoza-González, V., González-Burgos, I., Olvera-Cortés, M.E., Moralí, G., Cervantes, M. (2007) Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J. Pineal Res*. 42:139-146.
69. Leuner, B., Faldueto, J., Shors, T.J. (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J. Neurosci*. 23:659-665.
70. Logan, W.J., Snyder, S.H. (1972) High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain. Res*. 42:413-431.

71. Luján, R., Nusser, Z., Roberts, D.B., Shigemoto, R., Somogyi, P. (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 8:1488-1500.
72. Majeuska, A., Brown, E., Ross, J., Yuste, R. (2000) Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumps and calcium diffusion through the spine neck in biochemical compartmentalization. *J. Neurosci.* 20:1722-1734.
73. Matsuzaki, M. (2007) Factors critical for the plasticity of dendritic spines and memory storage. *Neurosci. Res.* 57:1-9.
74. Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H. (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature.* 429:761-766.
75. Mayer, M.L., Westbrook, G.L. (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.* 394:501-527.
76. McDonald, R.J., Hong, N.S., Craig, L.A., Holahan, M.R., Louis, M., Muller, R.U. (2005) NMDA-receptor blockade by CPP impairs post-training consolidation of a rapidly acquired spatial representation in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 22:1201-1213.
77. Medvedev, N.I., Popov, V.I., Rodríguez-Arellano, J.J., Doyère, V., Stewart, M.G. (2010) The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist CPP alters synapse and spine structure and impairs long-term potentiation and long-term depression induced morphological plasticity in dentate gyrus of the awake rat. *Neuroscience.* 165:1170-1181.
78. Meldrum, B. (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130:1007-1015.
79. Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baurdy, M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 319:774-776.
80. Moser, M.B., Trommald, M., Andersen, P. (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:12673-12675.
81. Muller, D., Nikonenko, I., Jourdain, P., Alberi, S. (2002) LTP, memory and structural plasticity. *Curr. Mol. Med.* 2:605-611.
82. Muller, D., Toni, N., Buchs, P.A. (2000) Spine changes associated with long-term potentiation. *Hippocampus.* 10:596-604.
83. Niswender C.M., Conn P.J. (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50:295-322.
84. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* 307:462-465.
85. O'Keefe, J., Nadel, L. (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map.* Oxford University Press, Oxford.
86. Okiyama, K., Smith, D.H., White, W.F., Richter, K., McIntosh, T.K. (1997) Effects of the novel NMDA antagonists CP-98,113, CP-101,581 and CP-101,606 on cognitive function and regional cerebral edema following experimental brain injury in the rat. *J. Neurotrauma.* 14:211-222.
87. Olvera-Cortés, E., López-Vázquez, M.A., Beas-Zárate, C., González-Burgos, I. (2005) Neonatal exposure to monosodium glutamate disrupts place learning ability in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82:247-251.
88. Paternain, A.V., Rodríguez-Moreno, A., Villarroel, A., Lerma, J. (1998) Activation and desensitization properties of native and recombinant kainate receptors. *Neuropharmacology.* 37:1249-1259.
89. Petrozzino, J.J., Connor, J.A. (1994) Dendritic Ca²⁺ accumulations and metabotropic glutamate receptor activation associated with an N-methyl-D-aspartate receptor-independent long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Hippocampus.* 4:546-558.
90. Rivera-Cervantes, M.C., Flores-Soto, M.E., Chaparro-Huerta, V., Reyes-Gómez, J., Feria-Velasco, A., Schliebs, R., Beas-Zárate, C. (2009) Changes in hippocampal NMDA-R subunit composition induced by exposure of neonatal rats to L-glutamate. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27:197-204.
91. Rothman, S.M. (1985) The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* 5:1483-1489.
92. Salinska, E., Wojciech, D., Lazarewicz, J.W. (2005) The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol.* 43:322-339.
93. Santini, E., Muller, R.U., Quirk, G.J. (2001) Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J. Neurosci.* 21:9009-9017.

94. Segal, M., Korkotian, E., Murphy, D.D. (2000) Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends Neurosci.* 23:53-57.
95. Sheng, M., Hoogenraad, C.C. (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Ann. Rev. Biochem.* 76:823-847.
96. Sommer, B., Monyer, H., Wisden, W., Verdoorn, T.A., Burnashev, N., Sprengel, R., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1992) Glutamate-gated ion channels in the brain. Genetic mechanism for generating molecular and functional diversity. *Arzneimittelforschung.* 42:209-210.
97. Sorra, K.E., Harris, K.M. (2000) Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus.* 10:501-511.
98. Spacek, J., Harris K.M. (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J. Neurosci.* 17:190-203.
99. Tarelo-Acuña, L., Olvera-Cortés, E., González-Burgos, I. (2000) Prenatal and postnatal exposure to ethanol induces changes in the shape of the dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal neurons of the rat. *Neurosci. Lett.* 286:13-16.
100. Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Povilaitite, P., Parisi, L., Muller, D. (2001) Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *J. Neurosci.* 21:6245-6251.
101. Volfovsky, N., Parnas, H., Segal, M., Korkotian, E. (1999) Geometry of dendritic spines affects calcium dynamics in hippocampal neurons: theory and experiments. *J. Neurophysiol.* 81:450-462.
102. Warren, S.G., Juraska, J.M. (1997) Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav. Neurosci.* 111:259-266.
103. Williams, J.H., Errington, M.L., Lynch, M.A., Bliss, T.V. (1989) Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature.* 341:739-742.
104. Wilson, Ch.J. (1984) Passive cable properties of dendritic spines and spiny neurons. *J. Neurosci.* 4:281-297.

9

MODELOS EXPERIMENTALES DE HIPOXIA-ISQUEMIA CEREBRAL

¹Ramos AJ, ²Merelli A, ¹Avilés-Reyes RX, ²Lazarowski A.

¹Laboratorio de Neuropatología Molecular, Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Fisiopatología y Bioquímica (INFIBIOC), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

DEFINICIÓN DE HIPOXIA-ISQUEMIA CEREBRAL

La hipoxia cerebral se produce cuando ocurre una pérdida (parcial o completa) del aporte de oxígeno al sistema nervioso central (SNC), aún en presencia de un adecuado flujo sanguíneo. Este concepto, muchas veces se confunde con el de isquemia cerebral, situación que se produce específicamente por una disminución del flujo sanguíneo cerebral, el cual no solamente producirá una consecuente pérdida del aporte de oxígeno, sino también de nutrientes y factores provenientes de la sangre. En el primer caso, deberíamos considerar todas aquellas patologías sistémicas, que generan una pérdida de la capacidad de entregar oxígeno al SNC (como a otros tejidos). Varias situaciones como la hipoxia anémica, defectos de ventilación u obstrucción pulmonar, interconexión izquierdo-derecha cardíaca, insuficiencia miocárdica, o asfixia neonatal, hipoxia hipobárica de la altura, o situaciones tóxicas como la inhalación de CO, etc., son las causas más comunes de un menor aporte de O₂. En todos estos casos, la hipoxia será un fenómeno sistémico, que buscará también respuestas sistémicas con mayor producción renal de eritropoyetina y el consecuente aumento en el recuento de los eritrocitos circulantes. La hipoxia es un estímulo biológico capaz de promover tanto mecanismos de rescate y supervivencia, como también de desencadenar una

secuencia de eventos irreversibles que llevan a la muerte celular, tisular e incluso del individuo.

Los cuadros isquémicos por obstrucción de vasos sanguíneos, generan un amplio espectro de efectos biológicos limitado al tejido, órgano o la parte del órgano comprometido por la irrigación interrumpida y el tejido buscará adecuarse a la nueva situación, en espera de la restitución del aporte normal de O₂ y nutrientes. Las células eucariotas han desarrollado un muy sensible y complejo mecanismo capaz de identificar la condición hipóxica, y dar respuestas rápidas tanto de rescate como de inducción de la muerte celular. Dichas respuestas ambivalentes a la hipoxia aguda o crónica, están mediadas por el factor de transcripción "*Hypoxia-Inducible Factor*" (HIF-1 α) (1,2). Si la hipoxia es importante y duradera, HIF-1 α activará la apoptosis vía p53, generando una zona de infarto con alta tasa de muerte celular. En el tejido circundante a dicha área crítica, el HIF-1 α estimulará una larga lista de genes destinados a restituir el O₂, nutrientes y energía al tejido afectado. En dicha área o "zona de penumbra", las células hipóxicas aún viables podrán y recuperar su metabolismo normal, o bien entrarán en una apoptosis tardía, incrementando el tamaño del infarto original (Figura 1). La síntesis de HIF-1 α es controlada por la enzima Prolinhidroxilasa que hidroxila al HIF-1 α en las prolinas 402 y 564. La proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL) se une a HIF-1 α en dichas prolinas y el macrocomplejo HIF-VHL es rápidamente degradado por el proteosoma. La prolinhidroxilasa es una HEM-proteína que se activa cuando se une al O₂. La disminución intracelular del O₂ desactiva la enzima, que no hidroxilará al HIF-1 α . Así, HIF-1 α queda estabilizado y será degradado, ya que VHL no puede reconocerlo (3) (Figura 2).

Durante la normoxia, no hay cantidades detectables de la proteína HIF-1 α cuya vida media es de escasos 5 minutos debido a su rápida degradación. A su vez, el Factor Inhibidor del HIF-1 α (FIH), hidroxila el residuo asparragina 803 del mismo e impide su unión al factor activador p300. Ante la hipoxia, esta síntesis-degradación del HIF-1 α es continua y a través de un doble control inhibitorio, se permite su inmediata acumulación y unión al HIF-1 β (*arylhydrocarbon receptor nuclear translocator*), formando un heterodímero fosforilado que al translocarse hacia el núcleo activa los genes sensibles a HIF-1 α (3).

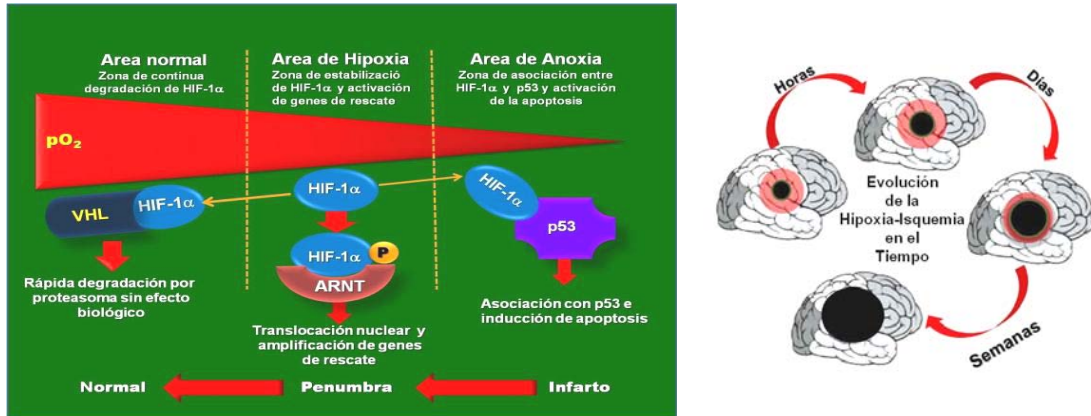


Figura 1. En el panel de la izquierda se representan las funciones de HIF1 α , según el entorno normal, hipóxico o anóxico. En el panel de la derecha se representa la progresión natural del tamaño del infarto.

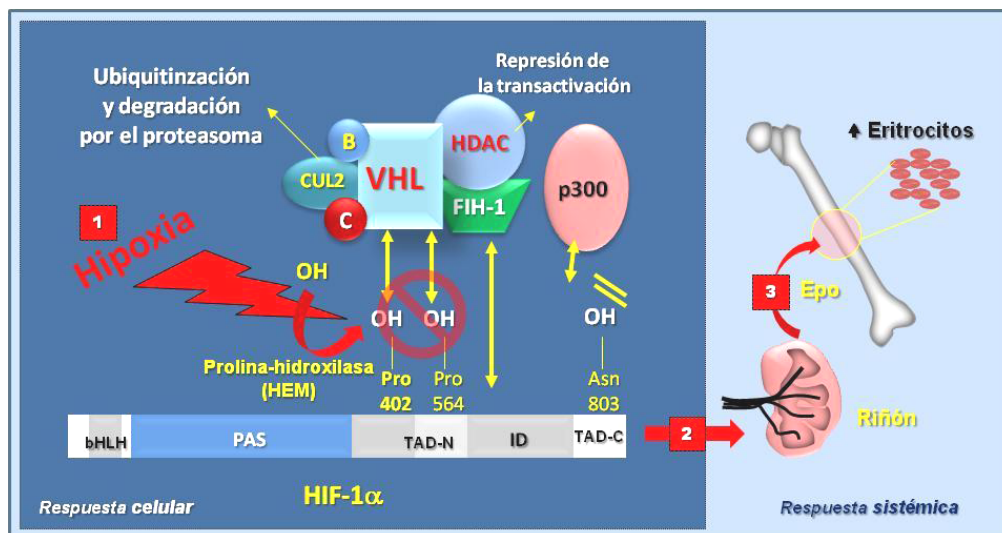


Figura 2. La respuesta celular ante la hipoxia (1), provoca la inhibición de las prolinhidroxilasas y estabiliza el HIF-1 α , el cual estimulará la síntesis de eritropoyetina (Epo) a nivel renal (2), quien como respuesta sistémica promoverá la producción de eritrocitos para restituir el aporte de O_2 (3).

Una vía de degradación del HIF-1 α independiente de O_2 , podría estar activa por acción de un factor HAF (*hypoxia-associated factor*), aún en condiciones hipóxicas o por exceso de estimulación de factores de crecimiento, que puede tener un rol clave en el crecimiento de las neoplasias. Si bien se han descrito las isoformas de HIF-2 α y HIF-3 α sus acciones biológicas aún no se han dilucidado por completo (4).

ASPECTOS NEUROBIOLÓGICOS

Si bien el cerebro comprende sólo el 2% de la masa corporal total, consume hasta el 20% de la energía producida en el organismo, y depende exclusivamente del trabajo

cardíaco para incorporar O_2 y glucosa como fuentes de ATP. Más allá del daño que la hipoperfusión o hipoxia global puedan producir sobre otros órganos o sistemas, el daño cerebral secundario a la falta de O_2 , constituye un amplio espectro de alteraciones que pueden incluir el coma, convulsiones, y trastornos motores y cognitivos diversos. El daño hipóxico desencadena procesos moleculares que culminan en el daño neuronal. Si la producción de ATP cae más del 50%, las neuronas pierden la capacidad de mantener el potencial de membrana, y desarrollarán una despolarización progresiva caracterizada por fallo en la actividad Na^+/K^+ -ATPasa con incremento intracelular de Na^+ y extracelular de K^+ . El proceso desembocará en un influjo masivo de Ca^{2+} , la producción de radicales libres, el estrés oxidativo y la muerte celular. Esta despolarización favorece la “sensibilidad” al estímulo excitador del glutamato (excitotoxicidad) que exacerba el deterioro e incrementa el área del infarto (5) (Figura1). Si bien este mecanismo implica un daño progresivo con edema, inflamación, apoptosis y finalmente necrosis, también es un proceso que podría evitarse o detenerse, e incluso sería “potencialmente” reversible. En la isquemia cerebral, las reservas de ATP se reducen rápidamente por falta de aporte y gasto continuo por parte de las bombas de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ que siguen funcionando por cierto tiempo. Los niveles fisiológicos de Ca^{2+} citosólico libre en un valor cercano a 100 nM duran poco tiempo, y la entrada masiva de Ca^{2+} al citosol con pérdida del gradiente iónico, produce una despolarización permanente de la membrana celular, y facilita la acción excitotóxica del glutamato por activación de los receptores NMDA. Así, el incremento intracelular de Ca^{2+} y de especies reactivas de oxígeno (ROS), fluctúa en un rango de concentraciones capaces de promover la apoptosis y necrosis celular, así como de respuestas de rescate y supervivencia (6). El rol del HIF-1 α resulta clave para la estimulación de genes como el Factor de Crecimiento Vascular (VEGF), la Eritropoyetina (Epo) y su receptor (Epo-R), enzimas glucolíticas, transportadores de glucosa y Fe (transferrina y su receptor), así como del gen de Resistencia Múltiple a Drogas (MDR-1), implicados en mecanismos antiapoptóticos de supervivencia y de restitución de energía y O_2 . La sobreexpresión del gen MDR-1 en las células endoteliales de la BHE (Barrera Hemato-Encefálica), puede ser uno de los factores limitantes del acceso de drogas neuroprotectoras al tejido dañado (7). Sin embargo, y acorde al nuevo concepto

“unidad neuro-vascular” (8), dicho mecanismo restrictivo estaría también presente en las propias neuronas que expresan el gen MDR-1 inducido por la hipoxia (9). El colapso en los gradientes iónicos provocados por la falta de ATP estimula la liberación y el abrupto incremento del glutamato en el espacio intersináptico, junto a la masiva despolarización de las membranas, que facilita la descarga excitatoria y se convierte en un factor epileptogénico.

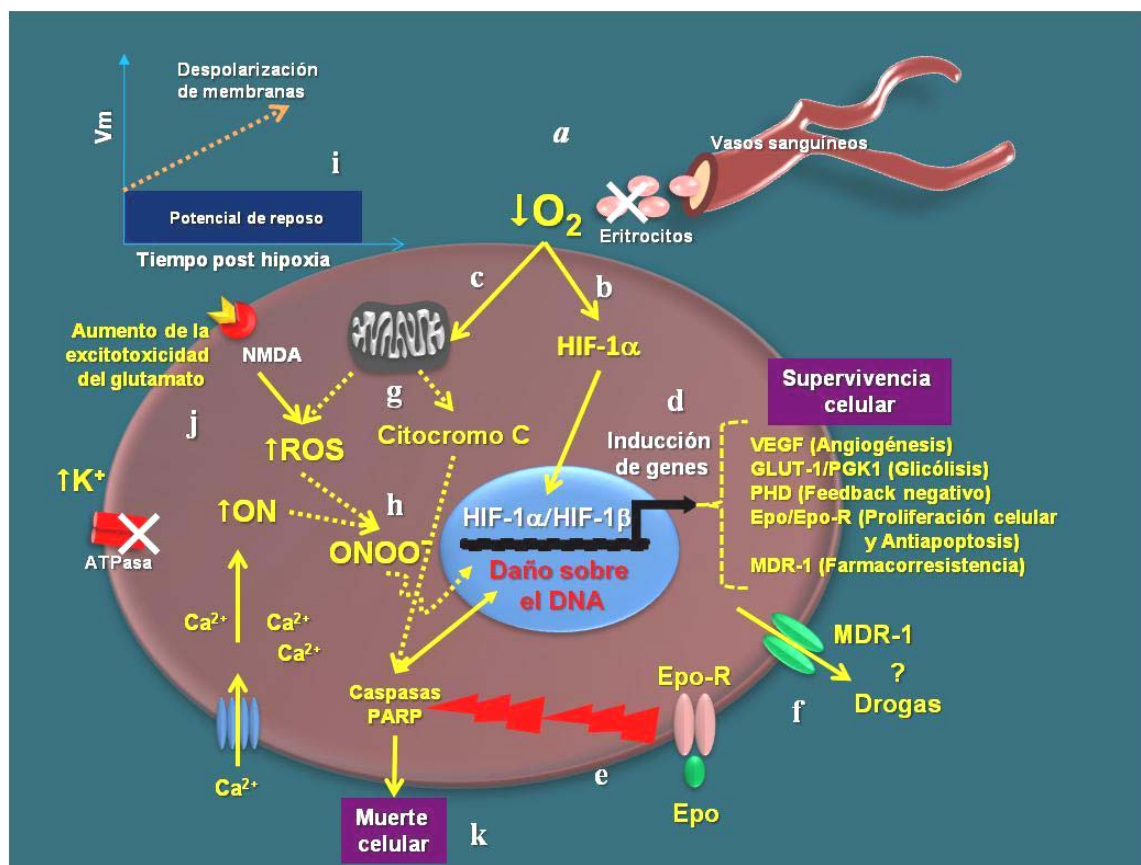


Figura 3. La hipoxia producida por un menor aporte de O_2 desde la sangre (a) activará HIF-1 α (b), y el estrés oxidativo mitocondrial (c). HIF-1 α estimulará distintos genes de rescate (d), entre ellos VEGF para formar nuevos vasos y recuperar el flujo sanguíneo perdido, Epo y Epo-R capaces de promover la proliferación celular. Tanto Epo/Epo-R como MDR-1 tienen efecto antiapoptótico (e), pero MDR-1, es también responsable de la farmacorresistencia (j). La activación de radicales libres y citocromo c (g), junto al influjo de Ca^{2+} promoverán, el bloqueo de la bomba de K^+ /ATPasa, con despolarización de las membranas (i), y mayor efecto excitotóxico del glutamato sobre los receptores NMDA (j). Este mecanismo refuerza la carga de radicales libres vía ON, con formación de peroxinitritos, daño en el DNA y muerte celular por activación de PARP (ADP-ribose-polymerase) y caspasas (k).

ESTRATEGIAS DE NEUROPROTECCIÓN

Las terapias de la hipoxia cerebral secundarias al infarto cerebral están dirigidas a intentar recuperar el flujo sanguíneo interrumpido. Diferentes estrategias de neuroprotección, ya sea por impedimento, interrupción o enlentecimiento de los

procesos de daño celular mencionados, han sido evaluados a través de diferentes modelos experimentales. Sin embargo la única terapia aceptada actualmente (aprobada por la FDA-USA), se basa en el uso de tPA recombinante humano (tPA-rh) para restaurar la normalidad sobre el fenómeno obstructivo (10). Se ha descrito que los complejos mecanismos celulares secundarios al insulto hipóxico generan la activación de neurotransmisores, factores neurotróficos, citoquinas y moléculas de adhesión, como parte de la respuesta del microambiente, capaces de modular las interconexiones neuronales como el crecimiento de neuritas, sinaptogénesis y plasticidad sináptica. La mayoría de estas vías de estímulo-represión, asociadas a la neurodegeneración-muerte neuronal, desembocan en cascadas de señales intracelulares que activan la formación de radicales libres y movilización del Ca^{2+} y llevaran a la apoptosis celular. Este mecanismo ha sido observado en patologías diversas como accidente cerebrovascular (ACV), Epilepsia, Alzheimer, Parkinson, o esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. La expresión cerebral de la eritropoyetina (Epo) y su receptor (Epo-R) es estimulada por el daño hipóxico vía HIF-1 α , y esta estimulación podría tener un efecto neuroprotector contra la excitotoxicidad mediada por el glutamato (5, 11, 12) (Figura 3).

Han surgido evidencias que el uso de factores tróficos como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y *Stem Cell Factor* (SCF), estimulan la producción de células progenitoras que desde la médula ósea, son capaces de reparar diferentes tejidos, y ayudar a la neovascularización de las áreas hipóxicas (13). Estas estrategias adolecen de la falta de efecto directo sobre la neurona hipóxica. El acceso de los fármacos antiapoptóticos administrados desde la periferia, está limitado por la sobre-expresión en la barrera hematoencefálica del gen MDR-1 inducido por el mismo proceso hipóxico. Aunque el mecanismo de acción por el cual el sistema Epo/Epo-R promueve la supervivencia celular no está totalmente esclarecido, podría estimular cascadas de señalización que activan genes antiapoptóticos, modular el Ca^{2+} intracelular y la producción de óxido nítrico (ON), inhibir la liberación de glutamato, lo que tendría efectos antioxidantes y anti-inflamatorios. Sin embargo, la auto-activación espontánea del sistema Epo/Epo-R no garantiza la neuroprotección, y resulta imprescindible un alto nivel de expresión de Epo-R y una cantidad suficiente de Epo administrada por vía exógena, para lograr su activación y

ejercer una acción neuroprotectora efectiva (14,15). Diferentes autores han mostrado en distintos modelos experimentales de hipoxia cerebral, que la administración de eritropoyetina recombinante humana (rH-Epo) tiene un efecto protector, disminuyendo el número de células apoptóticas, y frenando la expansión del área cerebral necrótica. Dado que el acceso de la Epo al SNC desde la periferia, está muy limitado, deben usarse altas dosis administradas por vía i.p., que ejercen efectos secundarios adversos como hipertensión y trombosis. Por tal motivo, varios grupos han investigado la administración de fármacos por vía nasal, incluyendo la Epo, con efectos positivos y sin consecuencias periféricas adversas. En nuestra experiencia, tanto en el modelo de hipoxia focal con CoCl_2 como en el modelo de apneas intermitentes (9, 16) las neuronas hipóxicas coexpresan el gen MDR-1 y el receptor de eritropoyetina (Epo-R). Esto sugiere que independientemente de la BHE, la neurona hipóxica sería “farmacorresistente” a drogas convencionales pero no a Epo. En el modelo de CoCl_2 , hemos podido comprobar que la administración intranasal de rH-Epo, preserva la actividad motora espontánea, sin estimulación de la producción de eritrocitos periféricos (17).

MODELOS EXPERIMENTALES DE HIPOXIA-ISQUEMIA CEREBRAL *IN VIVO*

El desarrollo de modelos experimentales de hipoxia-isquemia cerebral en animales de laboratorio es clave para estudiar los mecanismos de daño y así encontrar potenciales blancos moleculares que permitan una intervención terapéutica con el objetivo de disminuir el daño cerebral. La utilización de animales de laboratorio ha recibido en los últimos tiempos una severa crítica por parte de la opinión pública no especializada, sin embargo estos estudios siguen siendo claves para conocer las respuestas del cerebro en su conjunto a estos estados patológicos. Desde el punto de vista experimental, el trabajo con animales debe ser realizado en condiciones controladas, haciendo los mayores esfuerzos y planeando los experimentos de tal forma de minimizar el sufrimiento y el número de animales utilizados. Es imprescindible en estos estudios seguir las recomendaciones de entidades reconocidas internacionalmente como la *Society for Neuroscience* (18), los Institutos Nacionales de Salud de USA (19) y la normativa ARRIVE (20) que son imprescindibles para la publicación de los resultados de experimentos con animales

de laboratorio. Adicionalmente, la aprobación por el comité de ética de la Universidad o Instituto donde se desarrolla el trabajo es requerido para autorizar los estudios y permitir su posterior publicación en reuniones y revistas científicas, sin perder de vista que el objetivo es reproducir las circunstancias clínicas en pacientes (21). Si esto no es así, los mecanismos de daño y los potenciales mecanismos de protección generados son válidos solo para el modelo pero no para la patología, lo cual explica en parte el fallo generalizado de las estrategias de neuroprotección exitosas en modelos experimentales, que no tuvieron éxito en pruebas clínicas (22). La clave en este tipo de estudios es la elección del modelo experimental pero no menos importante es la elección de la forma de analizar el daño producido por el modelo y la interpretación de los resultados. A continuación, comentaremos los modelos de hipoxia-isquemia más difundidos y algunos aspectos de su relevancia clínica.

1. Modelos de isquemia global

1.1. Arresto cardíaco

En el terreno de la atención clínica, tal vez la manifestación más dramática de la isquemia global cerebral es la inducida por el arresto cardíaco. Si bien este modelo experimental es relativamente simple de ser llevado a cabo utilizando una inyección intracardiaca de cloruro de potasio, agentes cardioplégicos, flebotomías o asfixia (23-25), la resucitación conlleva cierta complejidad. El arresto cardíaco por agentes cardioplégicos es más fácilmente reversible, mientras que es mucho más dificultosa la recuperación de la actividad cardíaca luego de asfixia. Una vez que se restablece la actividad cardíaca, existe un periodo de tiempo variable hasta que se recupera la perfusión cerebral, esto es una seria complicación en este modelo ya que introduce una gran variabilidad en el tiempo de isquemia cerebral neta aplicada a los animales y por lo tanto en los efectos cerebrales de esta isquemia.

1.2 Arresto de la circulación cerebral

Para evitar la interferencia cardíaca en el desarrollo de la isquemia global, la mayoría de los modelos animales utilizados en la actualidad realizan un arresto selectivo de la circulación cerebral. Si bien estos modelos tienen un mejor pronóstico de sobrevivencia de los animales, representan un modelo ideal pocas veces

observado en la clínica y por lo tanto las conclusiones, fundamentalmente en la evaluación de estrategias de neuroprotección deben ser interpretadas con sumo cuidado.

1.2.1 Modelo de oclusión de cuatro vasos

Usualmente empleado en ratas, este modelo implica el bloqueo de las dos arterias vertebrales, seguida de la oclusión de ambas arterias carótidas comunes (26). En animales que no cuentan con el Polígono de Willis, el mismo efecto de isquemia global cerebral puede lograrse ligando las arterias carótidas comunes, ya que no cuentan con conexión entre la arteria carótida interna y la basilar (27). Existen otros modelos menos difundidos que incluyen desde el insuflado de un cinturón neumático en el cuello hasta la oclusión intratorácica de los vasos que alimentan tanto las carótidas como las arterias vertebrales (22). En estos modelos de isquemia global por oclusión de vasos, se debe tener especial consideración acerca de la circulación colateral que puede establecerse, para lo cual se realizan oclusiones adicionales de las arterias mamarias internas y de otras arterias del cuello o bien se reduce la tensión arterial a niveles de hipotensión. Otra consideración importante es que los modelos de oclusión de arterias generalmente llevan al vaciado de las venas y al desarrollo de una isquemia anémica, mientras que la oclusión de arterias y venas causa la congestión de la circulación cerebral (28). Este último punto es de vital importancia en la reperfusión, ya que el aumento de viscosidad producido por la estasis sanguínea o bien el vaciado de los vasos cerebrales cambia las condiciones necesarias para lograr la reperfusión, requiriendo usualmente, de mayores valores de tensión arterial para lograr la reperfusión (29).

1.2.2 Modelos de isquemia cerebral incompleta

Se basan fundamentalmente en lograr una reducción global del flujo sanguíneo cerebral y existen varios modelos, siendo el más utilizado la reducción de la tensión arterial por debajo de los límites de autorregulación de la circulación cerebral o bien el aumento de la presión intracraneal a niveles cercanos a la tensión arterial. Con este tipo de modelos se logra un efecto más potente de isquemia en las zonas periféricas irrigadas por las arterias cerebrales. Este modelo tiene la característica de inducir un gran daño cerebral, mayor que en la isquemia completa, debido a que

la baja irrigación provee glucosa necesaria para el metabolismo anaerobio, aumentando la acidosis, la liberación de glutamato y la hinchazón celular (30, 31).

2. Modelos de isquemia focal

En el área clínica, la mayoría de las isquemias cerebrales son de tipo focal. El equivalente clínico de la isquemia focal experimental es el infarto cerebral o *stroke*. Estudios epidemiológicos han demostrado que un 65% de los ataques cerebrales se producen debido a la oclusión vascular del territorio irrigado por la arteria media cerebral, siendo así la principal causa de isquemia cerebral en humanos (28,32). Por esto, el modelo de isquemia cerebral focal más difundido es el modelo de oclusión de arteria cerebral media (MCAO) pero por razones de complejidad técnica y costos, se han desarrollado también otros modelos que describiremos en esta sección.

2.1 Oclusión de la arteria carótida común

Como comentamos anteriormente, los gerbos y algunas cepas de ratones tienen un polígono de Willis incompleto al que le falta la arteria comunicante posterior. De esta forma, la simple ligación unilateral de la arteria carótida común a la altura del cuello del animal es suficiente para producir una isquemia focal unilateral. En animales con polígono de Willis completo, como la rata, este modelo tiende a producir isquemias de muy variable intensidad debido a que el calibre de la arteria comunicante anterior tiene mucha variación entre individuos de una misma especie.

2.1.1 Oclusión de la arteria carótida común y anoxia / hipoxia

En animales con polígono de Willis intacto, la oclusión extracraneal unilateral de la arteria carótida común en combinación con hipoxia/anoxia produce una isquemia focal en el hemisferio ipsilateral a la oclusión (33). La utilización de este modelo es muy simple desde el punto de vista experimental pero los resultados son complejos para interpretar debido a que la superposición de isquemia e hipoxia/anoxia global dispara múltiples mecanismos de regulación y protección como comentamos en las secciones anteriores. Sin embargo, debido a que este modelo es fácilmente adaptable a animales muy pequeños, se ha utilizado ampliamente en el estudio del daño hipoxi-isquémico en animales neonatos (34) y hoy se podría considerar como el modelo de elección para estudio de isquemia-hipoxia en el cerebro inmaduro. En este modelo, los animales neonatos (7 días de vida para las ratas) son sometidos a una ligación en la arteria carótida común, y luego expuestos a 8% O₂/balance N₂. Se

ha observado que pueden sobrevivir unas 3 horas antes de que se observe una mortalidad elevada (34, 35). El daño isquémico se observa en el hemisferio ipsilateral a la ligación de la arteria carótida común e incluye la corteza cerebral, la sustancia blanca subcortical y periventricular, el estriado y el hipocampo. Desde su descripción en 1981 este modelo ha permitido un gran desarrollo del conocimiento acerca de los mecanismos involucrados en la hipoxia perinatal. Acorde con el proceso de desarrollo cerebral, este modelo realizado en ratas de 7 días de vida representa la situación de hipoxia-isquemia equivalente a un feto humano o un recién nacido de 32-34 semanas de gestación (35).

2.2 Oclusión de la arteria cerebral media

La oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en su origen interrumpe el flujo sanguíneo hacia el territorio vascular irrigado por esta arteria, incluyendo los ganglios basales que reciben irrigación por las arterias lenticulo-estriatales. Estas ramificaciones de la arteria cerebral media (ACM) son arterias terminales, que en contraste con las ramas corticales no forman colaterales con los territorios vasculares adyacentes (36). Por ello, el efecto de la MCAO es una isquemia gradual desde niveles leves de isquemia en la corteza a una isquemia severa en los ganglios basales.

Se supone que esta gradual isquemia permite el desarrollo de zonas de penumbra que rodean al núcleo isquémico tal como se observa en la práctica clínica (28). Sin embargo, la extensión de los territorios de penumbra y núcleo isquémico son muy variables de acuerdo a la técnica utilizada y a la especie y cepa del animal de experimentación elegido. El modelo de MCAO puede ser desarrollado con diferentes aproximaciones técnico-experimentales:

-MCAO transorbital: es compleja de desarrollar, requiere la remoción del globo ocular y fue originariamente desarrollada para ser utilizada en monos (37). Tiene la ventaja de que no requiere la retracción de áreas cerebrales para acceder al origen de la arteria cerebral media, pero requiere un gran entrenamiento en técnicas de microcirugía para obtener resultados reproducibles.

-MCAO transcraneal: es el modelo más utilizado en ratas y ratones debido a que en estas especies la arteria cerebral media aparece sobre la superficie cortical cerca de su origen en la arteria carótida interna. Cuanto más distal es la oclusión, más

variable es el tamaño del infarto y por ello, en ratas, se recomienda la remoción del hueso zigomático para acceder al segmento proximal de la arteria. Esta desventaja en experimentos de largo plazo es debido a las complicaciones que los animales pueden tener para alimentarse.

-MCAO por filamento intraluminal: actualmente este es el modelo más utilizado para realizar MCAO temporal (38). Un filamento de nylon para suturas, al cual se le realiza un engrosamiento en el extremo, se debe introducir en la arteria carótida común y se avanza hasta que el engrosamiento alcanza la bifurcación hacia la ACM obstruyendo allí la circulación sanguínea. La localización del filamento en el origen de la ACM obstruye totalmente la circulación a su territorio de irrigación y usualmente también disminuye la circulación por colaterales, con lo cual la isquemia es generalizada y suele comprometer dos tercios del hemisferio afectado, con lo cual penumbra se reduce a un pequeño anillo alrededor del gran núcleo isquémico (39). El gran infarto producido, afecta generalmente la viabilidad de los animales y produce un masivo edema cerebral, por lo que generalmente se realiza la reperusión retirando el filamento en 1-2 horas con lo que mejoran significativamente la supervivencia y la recuperación tisular (28).

-MCAO por tromboembolismo: en un intento por asemejar los paradigmas experimentales a las situaciones clínicas en seres humanos, se desarrollaron los modelos que utilizan trombos producidos con sangre autóloga⁴⁰. Estos modelos, inherentemente variables, requieren de una gran estandarización que incluye la formación de trombos cilíndricos utilizando túbulos calibrados y un nivel controlado de fibrina (ricos o pobres en fibrina) ya que de ello dependerá la recanalización posterior con activadores de la trombolisis (41). La mayor aplicación de estos modelos es en el estudio de la trombolisis experimental y los efectos de la recanalización post-isquemia.

-MCAO de tres vasos: con el objetivo de obtener infartos corticales de mayor magnitud (recordemos que la MCAO clásica genera un gran infarto en los ganglios basales y tiene gran variabilidad en las áreas corticales) se desarrolló el modelo de oclusión de tres vasos que consiste en ocluir simultáneamente las dos arterias carótidas comunes y la ACM con la técnica del filamento intraluminal (42).

2.3 Oclusión de la microvasculatura

2.3.1 Oclusión fototrombótica

Se utiliza el colorante rosa de Bengala que se infunde por vía intravenosa y luego se realiza una iluminación con un láser de argón de una zona específica de la corteza donde se desea originar la isquemia (43). El colorante rosa de Bengala es un potente fotosensibilizador que induce, al ser iluminado por el láser, una coagulación intravascular local y la penumbra (isquémica) se rodea de una zona de hiperemia reactiva que difiere mucho de la penumbra isquémica real.

2.3.2 Microembolización

Este modelo permite el desarrollo tanto de accidentes isquémicos transitorios (TIA) o bien isquemias graduales. Para los primeros se utiliza la inyección de activadores de la agregación plaquetaria (44) (ADP; ácido araquidónico) o el uso de fototrombosis. Para el desarrollo de isquemia se utilizan partículas de mayor tamaño inyectadas en la arteria carótida, como ser dextrán, polietileno, microesferas de vidrio de 20-50 μm de diámetro (45,46). En estos modelos se produce un rápido edema debido a un abrupto aumento en el volumen sanguíneo que rodea a la obstrucción y se produce una rápida caída de la barrera hematoencefálica. El edema cerebral más que la isquemia, determina la evolución de estos animales (47).

2.3.3 Desvascularización cortical

Como se comentó en los puntos anteriores y se discute más extensamente en las conclusiones de este trabajo, el estudio de la muerte neuronal retardada en la penumbra isquémica se revalorizó en los últimos años. Hoy, está muy claro que las estrategias de neuroprotección intentan el rescate de las neuronas de la penumbra, ya que la zona de infarto o núcleo isquémico muere en el lapso de minutos y no permite una intervención terapéutica efectiva. Muchos de los modelos anteriores, si bien muy utilizados, producen zonas de penumbra muy pequeñas frente al volumen total del infarto y por lo tanto los cambios en la sobrevivencia de las neuronas de la penumbra usualmente no llevan a diferencias significativas en la evolución de la lesión (Figura 4).

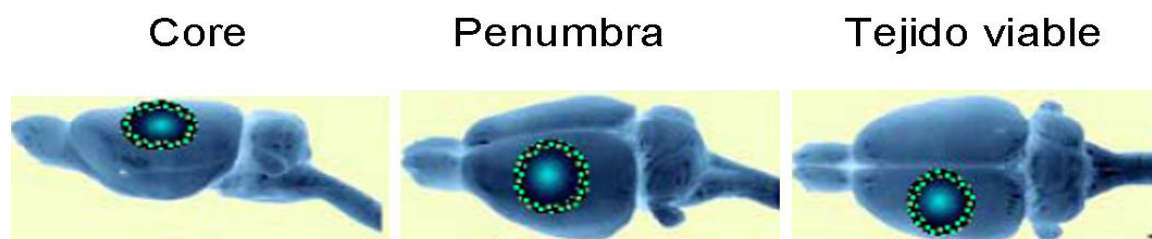


Figura 4. Las imágenes muestran la distribución relativa de las zonas del núcleo isquémico (infarto), la penumbra y el tejido viable circundante en un modelo de isquemia focal cortical.

Originalmente, utilizado como un modelo para inducir degeneración retrograda de las neuronas colinérgicas de los núcleos basales (48-50), el modelo de desvascularización cortical ha demostrado producir amplias zonas de penumbra donde es posible la evaluación certera de la sobrevivencia neuronal (Figura 5A). Asimismo, este modelo ha permitido el estudio de los factores tróficos que regulan la sobrevivencia neuronal (51-53), la prueba de estrategias de neuroprotección (54-56) y de la interacción entre neuronas y células de la glía en la zona de penumbra, brindando una mayor información acerca de la comunicación neuroglial y su papel en la determinación de la sobrevivencia neuronal (56,57) (Figura 5B). El modelo de desvascularización cortical consiste en realizar un pequeño daño al tejido en una zona limitada de la pía-aracnoides que cubre la corteza cerebral. Esta degeneración de los vasos superficiales induce un infarto limitado y una zona de penumbra con abundante gliosis reactiva y diferentes tasas de sobrevivencia neuronal (52, 56).

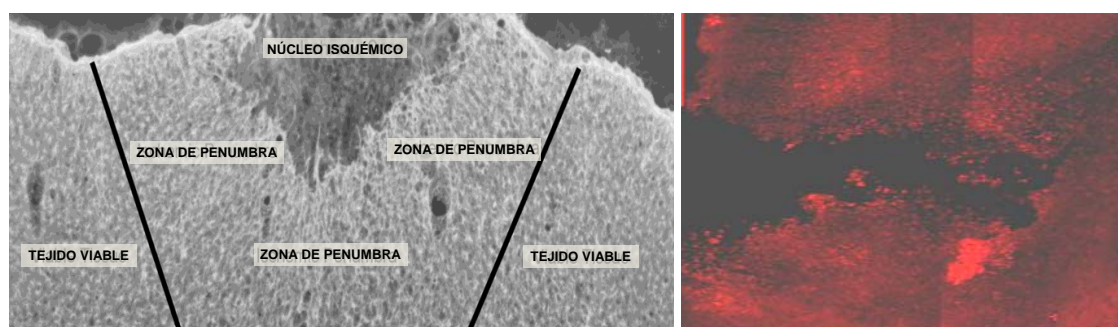


Figura 5A (Izquierda). La imagen muestra el núcleo isquémico y la penumbra en el modelo de desvascularización cortical en secciones de cerebro de rata inmunomarcadas para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). **Figura 5B (Derecha).** La imagen muestra la presencia de células expresando un receptor para la proteína S100B de origen glial. La expresión del receptor (rojo) se induce por la isquemia.

Una vez que la técnica de la lesión y los parámetros de localización, tamaño e instrumento para realizar el daño isquémico injuria son estandarizados, la técnica

de desvascularización cortical de las meninges es muy simple y provee de lesiones estables y sensibles a tratamientos de neuroprotección.

2.3.4 Hipoxia-isquemia química por cloruro de cobalto (CoCl₂)

La capacidad del CoCl₂ de inducir hipoxia química es conocida desde hace varias décadas debido a su capacidad de interferir con la función del hierro en el grupo Hemo de la hemoglobina y del citocromo c. Por otra parte, el CoCl₂ tiene la capacidad de activar en forma directa al HIF-1 α , lo que desencadena en las células una respuesta adaptativa similar a la hipoxia real (Figura 6). Si bien existen reportes que utilizan el CoCl₂ en forma sistémica por vía intraperitoneal, hemos considerado que esta vía produce una grave alteración de la fisiología hepática y de otros órganos con alto consumo de O₂ no siendo útil para producir hipoxia-isquemia cerebral debido a la cantidad de efectos secundarios. Por ello desarrollamos un modelo de inyección intracortical de CoCl₂ que produce un daño hipoxi-isquémico de tipo químico localizado, con una región de núcleo isquémico clásico y una zona de penumbra rodeándolo (9) (Figura 6). Recientemente, hemos demostrado que las alteraciones en el comportamiento motor de los animales sometidos a esta lesión son revertidas por la administración de EPO recombinante humana (17).

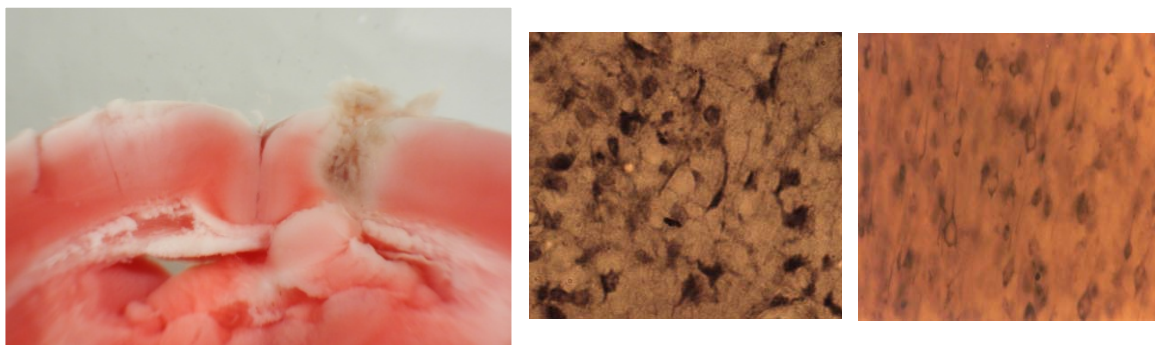


Figura 6. Imagen de la izquierda: lesión cortical producida por la inyección directa de CoCl₂. Imagen al medio: células HIF-1 α positivas en el área de penumbra. Imagen a la derecha: célula MDR-1 positivas en el área de penumbra. Las mismas células resultaron positivas para Epo-R (no mostrado).

CONCLUSIONES FINALES Y PROYECCIÓN

Tal como comentamos a lo largo de este trabajo, la mayoría de las numerosas estrategias de neuroprotección exitosas a nivel experimental que se han examinado en ensayos clínicos en las últimas dos décadas, han fracasado, demostrando ser incapaces de proveer la neuroprotección buscada. Únicamente la administración de

tPA recombinante humano está autorizada por la FDA y los organismos de Salud Pública de la mayoría de los países. Sin embargo, tPA es altamente costoso, tiene una ventana de administración muy estrecha (4 h) y no es aconsejado cuando existen riesgos de hemorragias, que complicarían aún más el cuadro de hipoxia-isquemia cerebral. Es fundamental el desarrollo de nuevas estrategias de neuroprotección que puedan ser útiles en la clínica. El fracaso masivo en las pruebas clínicas se debe principalmente a:

-Fallas en el desarrollo de los modelos experimentales y la detección del punto final para evaluar neuroprotección. El ejemplo clásico es la utilización de animales experimentales jóvenes mantenidos en condiciones óptimas ambientales, saludables y libres de estrés, cuando los seres humanos que sufren hipoxia-isquemia generalmente tiene patologías de base como hipertensión, diabetes, obesidad, adicciones al tabaco, alcohol o drogas, sufren de estrés o viven en condiciones no óptimas, y además, es altamente probable que sean añosos. La utilización de animales hipertensos o propensos a la diabetes, animales adultos o envejecidos puede dar un acercamiento mayor a la realidad clínica. En cuanto a la detección del punto final para demostrar neuroprotección podemos decir por ejemplo que demostrar la reducción del volumen del infarto o bien el rescate de las neuronas, no necesariamente indica que estas sean completamente funcionales en las redes neuronales o bien que su funcionamiento no altera el equilibrio global de las redes lo que podría ser la base biológica para la epilepsia post-isquemia. De la misma forma, la mejoría de los parámetros conductuales podría indicar la facilitación del establecimiento de redes alternativas antes que la mejoría de la sobrevida neuronal.

-Fallas en la planificación de la estrategia de neuroprotección. En este sentido, la mayoría de las estrategias de neuroprotección intentaron la disminución de la muerte neuronal, sin prestar mayor atención a la respuesta glial (microglial y astrogial) y a la participación del endotelio vascular. Hoy sabemos que la hipoxia-isquemia altera gravemente el funcionamiento de la unidad neuro-glio-vascular (8) y que las estrategias de protección deben apuntar a conservar la integridad funcional de esta unidad. En la penumbra, la disfunción del endotelio capilar y los astrocitos precede a la muerte neuronal. El aprovechamiento de los mecanismos de comunicación neuroglial capaces de inducir sobrevida o muerte neuronal,

sinaptogénesis o plasticidad sináptica es fundamental para mejorar las posibilidades de que las neuronas sobrevivan al daño en una forma funcionalmente integrada y equilibrada con las redes a las que pertenecen.

-Dificultades con la farmacocinética de las drogas utilizadas. Un gran número de estrategias de neuroprotección encontraron limitaciones graves en las pruebas clínicas debido a la dificultad de las moléculas desarrolladas para atravesar la barrera hematoencefálica, primero y posteriormente, para alcanzar concentraciones óptimas en el cerebro. Los factores tróficos son el ejemplo de los primeros, mientras que las proteínas bloqueadoras de apoptosis por unión a los sitios activos de las enzimas caspasas, son ejemplos de los segundos.

Adicionalmente, la expresión de transportadores de xenobióticos como MDR-1 inducido por la isquemia (9, 16, 58) podría ser una nueva dificultad para alcanzar concentraciones óptimas de las moléculas en la biofase. Sería fundamental la aplicación de inhibidores de estos transportadores (59, 60) en conjunto con las moléculas que son examinadas, para poder determinar su verdadera capacidad neuroprotectora.

Finalmente creemos que el aprovechamiento de los mecanismos de desarrollo y plasticidad que el cerebro adulto reprime en forma activa en condiciones normales, es la clave para encontrar puntos de control que modulen el desarrollo de la patología hipoxi-isquémica. Si logramos esto a nivel experimental, estaremos mucho más cerca de encontrar estrategias de neuroprotección para el control de una patología que es la segunda causa de muerte o con mayor número de secuelas de discapacidad a nivel mundial.

REFERENCIAS

1. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:551.
2. Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest* 2000;106:809.
3. Chen W, Ostrowski RP, Obenaus A, Zhang JH. Prodeath or Prosurvival: Two Facets of Hypoxia Inducible Factor-1 in Perinatal Brain Injury. *Exp Neurol.* 2009; 216:7.
4. Dang CV, Kim J, Gao P, Jason Yustein. The interplay between MYC and HIF in cancer *Nature Reviews Cancer* 2008;8:51.
5. Ratan RR, Siddiq A, Smirnova N, Karpisheva K, Haskew-Layton R, McConoughey S, Langley B, Estevez A, Huerta PT, Volpe B, Roy S, Sen ChK, Gazaryan I, Cho S, Fink M, LaManna J. Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke. *J Mol Med* 2007;85:1331.

6. Mattson MP. Free radicals, calcium, and the synaptic plasticity-cell death continuum: emerging roles of the transcription factor NFκB. In: Bradley RJ, Harris RA & Jenner P. Eds. *Int Rev Neurobiol* 1998;42:103.
7. Spudich A, Kilic E, Xing H, Kilic U, Rentsch KM, Wunderli-Allenspach H, Bassetti CL, Hermann DM. Inhibition of multidrug resistance transporter-1 facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia. *Nat Neurosci*. 2006;9:487.
8. del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med*. 2006;354(6):553.
9. Lazarowski A, Caltana L, Merelli A, Rubio MD, Ramos AJ, Brusco A. Neuronal mdr-1 gene expression after experimental focal hypoxia: a new obstacle for neuroprotection? *J Neurol Sci*. 2007;258(1-2):84.
10. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) rt-PA Stroke Study Group. A systems approach to immediate evaluation and management of hyperacute stroke: experience at eight centers and implications for community practice and patient care. *Stroke* 1997;28:1530.
11. Walshe TE, D'Amore PA. The role of hypoxia in vascular injury and repair. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:615.
12. LaManna J. Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke. *J Mol Med* 2007;85:1331.
13. Minnerup J, Sevimli S, Schäbitz WR. Granulocyte-colony stimulating factor for stroke treatment: mechanisms of action and efficacy in preclinical studies. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 2009,1:2.
14. Cerami A, Brines M, Ghezzi P, Cerami C, Itri LM. Neuroprotective properties of epoetin alfa. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:8.
15. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin: cytoprotection in vascular and neuronal cells. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003;3:141.
16. Aviles-Reyes RX, Angelo MF, Villarreal A, Rios H, Lazarowski A, Ramos AJ. Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *J Neurochem*. 2010;112:854.
17. Merelli A, Caltana L, Girimonti P, Ramos AJ, Lazarowski A, Brusco A. Effects of Intranasal delivery of Human Recombinant Erythropoietin (rHuEpo) on spontaneous motor activity in hypoxic rats. (2010; In press)
18. www.sfn.org
19. www.nih.gov
20. www.plosbiology.com
21. Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, Macleod M, Mignini LE, Jayaram P, Khan KS. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ*. 2007;334(7586):197.
22. Hossmann KA, Zimmermann V. Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res*. 1974;81:59.
23. Kofler J, Hattori K, Sawada M, DeVries AC, Martin LJ, Hurn PD, Traystman RJ. Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Neurosci Methods*. 2004;136:33.
24. Behringer W, Prueckner S, Safar P, Radovsky A, Kentner R, Stezoski SW, Henchir J, Tisherman SA. Rapid induction of mild cerebral hypothermia by cold aortic flush achieves normal recovery in a dog outcome model with 20-minute exsanguination cardiac arrest. *Acad Emerg Med*. 2000;12:1341.
25. Liachenko S, Tang P, Hamilton RL, Xu Y. A reproducible model of circulatory arrest and remote resuscitation in rats for NMR investigation. *Stroke*. 1998;29:1229.
26. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 1979;10(3):267.
27. Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol*. 1966;16(3):255.
28. Hossmann K. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacol*. 2008;55(3):257.
29. Fischer EG, Ames 3d A. Studies on mechanisms of impairment of cerebral circulation following ischemia: effect of hemodilution and perfusion pressure. *Stroke*. 1972;3:538.
30. Li PA, Shuaib A, Miyashita H, He QP, Siesjö BK, Warner DS. Hyperglycemia enhances extracellular glutamate accumulation in rats subjected to forebrain ischemia. *Stroke*. 2000;31:183.

31. Li PA, Rasquinha I, He QP, Siesjö BK, Csiszár K, Boyd CD, MacManus JP. Hyperglycemia enhances DNA fragmentation after transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:568.
32. Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke.* 1988;19:1083.
33. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960;36:1.
34. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, Vannucci SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res.* 1999;55:158.
35. Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci.* 2005;27(2-4):81.
36. Zülch, KJ 1981. Cerebrovascular pathology and pathogenesis as a basis of neuroradiological diagnosis. In von Diethelm, L, Heuck F, Olsson O, Strnad F, Vieten H Zuppinger A (Eds). *Handbuch der Medizinischen Radiology*, vol 14 1A Springer, Berlin, pp, 1-192.
37. Hudgins WR, Garcia JH. Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke.* 1970;1:107.
38. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Japanese Journal of Stroke* 1986;8:1.
39. Mies G, Ishimaru S, Xie Y, Seo K, Hossmann KA. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991;11:753.
40. Dinapoli VA, Rosen CL, Nagamine T, Crocco T. Selective MCA occlusion: a precise embolic stroke model. *J Neurosci Methods.* 2006;154(1-2):233.
41. Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann KA. Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke.* 2003;34(8):2019.
42. Yanamoto H, Nagata I, Niitsu Y, Xue JH, Zhang Z, Kikuchi H. Evaluation of MCAO stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *Exp Neurol.* 2003;182:261.
43. Wester P, Watson BD, Prado R, Dietrich WD. A photothrombotic 'ring' model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion. *Stroke.* 1995;26:444.
44. Furlow TW Jr, Bass NH. Arachidonate-induced cerebrovascular occlusion in the rat. The role of platelets and aspirin in stroke. *Neurology.* 1976;26:297.
45. Winding O. Cerebral microembolization following carotid injection of dextran microspheres in rabbits. *Neuroradiology.* 1981;21:123.
46. Nagano H, Suzuki T, Hayashi M, Asano M. Cerebral microcirculatory changes after cerebral embolization induced by glass bead injection in rabbits. *Angiology.* 1992;43:678.
47. Demura N, Mizukawa K, Ogawa N, Yamashita K, Kanazawa I. A cerebral ischemia model produced by injection of microspheres via the external carotid artery in freely moving rats. *Neurosci Res.* 1993;17:23.
48. Liberini P, Cuello A. Primate models of cholinergic dysfunction. *Funct Neurol.* 1995;10:45.
49. Figueiredo BC, Piccardo P, Maysinger D, Clarke PB, Cuello AC. Effects of acidic fibroblast growth factor on cholinergic neurons of nucleus basalis magnocellularis and in a spatial memory task following cortical devascularization. *Neuroscience.* 1993;56:955.
50. Ginestet L, Ferrario JE, Raisman-Vozari R, Hirsch EC, Debeir T. Donepezil induces a cholinergic sprouting in basocortical degeneration. *J Neurochem.* 2007;102:434.
51. Karl JM, Alaverdashvili M, Cross AR, Whishaw IQ. Thinning, movement, and volume loss of residual cortical tissue occurs after stroke in the adult rat as identified by histological and magnetic resonance imaging analysis. *Neuroscience.* 2010 Jun 30. [Epub ahead of print]
52. Angelo MF, Avilés-Reyes RX, Villarreal A, Barker P, Reines AG, Ramos AJ. p75^{NTR} expression is induced in isolated neurons of the penumbra after ischemia by cortical devascularization. *J Neurosci Res.* 2009;87:1892.
53. Debeir T, Marien M, Ferrario J, Rizk P, Prigent A, Colpaert F, Raisman-Vozari R. In vivo upregulation of endogenous NGF in the rat brain by the alpha2-adrenoreceptor antagonist dexefaroxan: potential role in the protection of the basocortical cholinergic system during neurodegeneration. *Exp Neurol.* 2004;190:384.
54. Bartnik BL, Spigelman I, Obenaus A. Cell-permeant calcium buffer induced neuroprotection after cortical devascularization. *Exp Neurol.* 2005;192:357.

55. Chopin P, Debeir T, Raisman-Vozari R, Colpaert FC, Marien MR. Protective effect of the alpha2-adrenoceptor antagonist, dexefaroxan, against spatial memory deficit induced by cortical devascularization in the adult rat. *Exp Neurol.* 2004;185:198.
56. Ramos AJ, Rubio MD, Defagot C, Hirschberg L, Villar MJ, Brusco A. The 5HT1A receptor agonist, 8-OHDPAT, protects neurons and reduces astroglial reaction after ischemic damage caused by cortical devascularization. *Brain Res.* 2004 Dec 31;1030(2):201.
57. Villarreal A, Avilés-Reyes RX, Angelo MF, Reines AG, Ramos AJ. RAGE and NF- κ B dependent S100B effects on neuronal survival and neurite extension. *J. Neurochem.* 2010, in press.
58. Ramos AJ, Lazarowski A, Villar MJ, Brusco A. Transient expression of MDR-1/P-glycoprotein in a model of partial cortical devascularization. *Cell Mol Neurobiol.* 2004;24:101.
59. Höcht C, Lazarowski A, Gonzalez NN, Auzmendi J, Opezso JA, Bramuglia GF, Taira CA, Girardi E. Nimodipine restores the altered hippocampal phenytoin pharmacokinetics in a refractory epileptic model. *Neurosci Lett.* 2007;14;413:168.
60. Robey RW, Lazarowski A, Bates SE. P-glycoprotein--a clinical target in drug-refractory epilepsy? *Mol Pharmacol.* 2008;73:1343.

10

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ASOCIADAS A LA NEUROPROTECCIÓN EN LA ISQUEMIA

Beas-Zárate C, Ureña-Guerrero ME, Saucedo-Arellano L, Murguía-Castillo J, Rivera-Cervantes MC.

Instituto de Neurobiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

INTRODUCCION

Los accidentes cerebro-vasculares (ACV) se consideran un problema de salud pública a nivel mundial; en países industrializados son la tercer causa de muerte, únicamente superados por las enfermedades del corazón y el cáncer (Feigin y col., 2003, Rosamond y col., 2007). La mayoría de los ACV (85%) son de tipo “isquémico”, y tienen su origen en la oclusión aguda de alguna de las principales arterias cerebrales por un trombo o un émbolo, lo que origina un descenso en la perfusión de la región cerebral irrigada por dicha arteria.

Después de un evento isquémico agudo, la restricción en el flujo sanguíneo hacia el tejido cerebral conduce a un aporte insuficiente de oxígeno y glucosa para sustentar la homeostasis celular (González y col., 2006). La región cerebral que se abastece exclusivamente por la arteria ocluida presenta daño irreversible, ya que se desencadenan mecanismos de muerte celular rápida de tipo necrótica, a esta región se le conoce como **núcleo isquémico**. Además, alrededor del núcleo isquémico, donde el tejido se abastece de flujo sanguíneo colateral, se activan mecanismos de daño y de sobrevivencia, que determinan el destino de las células, a esta región se le conoce como **zona de penumbra**; en esta zona, la muerte celular presenta características de daño apoptótico (González y col., 2006). La excitotoxicidad, el estrés oxidativo, y la inflamación son los principales eventos que conducen a la muerte neuronal en el tejido hipóxico-isquémico; cada uno de ellos se activa y se

propaga a través de sistemas de señalización intercelular e intracelular selectivos. El conocimiento de estos sistemas de señalización de forma integral podría garantizar la eficiencia y la seguridad de un tratamiento más efectivo en esta patología.

El éxito de un abordaje terapéutico para proveer neuroprotección, en el tejido cerebral, el cual se encuentra funcionalmente dañado pero viable y por lo tanto potencialmente rescatable, depende del periodo de tiempo crítico durante el cual el tejido cerebral está en riesgo; a este periodo se le refiere como ventana de oportunidad para mejorar el resultado neurológico, a través de la intervención terapéutica (Mehta, 2007). A pesar de que son varios los mecanismos celulares y moleculares que se conjuntan para disparar el daño, los avances de los últimos años han permitido dilucidar diferentes etapas de estos eventos en el proceso isquémico, los cuales son fundamentales para centrar los esfuerzos en reducir el daño neuronal que se produce (Alcaraz-Zubeldia y Ríos, 2004). Por lo tanto, los objetivos en investigación, se encaminan de manera importante al diseño de nuevas estrategias enfocadas a la neuroprotección, del tejido cerebral, potencialmente rescatable.

La consecuencia metabólica inmediata que se produce después de la isquemia es la disminución en la disponibilidad de ATP y fosfocreatina, por lo que todas las reacciones dependientes de ATP se comprometen y afectan el metabolismo. La degradación anaeróbica de las reservas de glucosa genera ácido láctico, que se acumula y provoca reducción en el pH hasta valores de 6.5. Esta acidosis desplaza al Ca^{++} de su unión a proteínas, y hace aumentar su concentración intracelular. Adicionalmente, la pérdida en la disponibilidad de ATP, produce deficiencias en la capacidad de los mecanismos de transporte para regular la homeostasis iónica, fundamentalmente por una reducción en la actividad de la bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$, lo que mantiene el potencial de membrana en valores despolarizantes e induce la activación de diferentes eventos, entre ellos:

- La generación de potenciales de acción, que promueven la liberación del ácido glutámico (Glu), entre otros neurotransmisores, de las terminales presinápticas.

- La activación excesiva de receptores a glutamato (R-Glu) post-sinápticos, lo que induce a un incremento en el ingreso no controlado de Na^+ y Ca^{++} a las neuronas (Dugan y Choi, 1999).
- La entrada sostenida de Ca^{++} a la neurona, y su excesiva acumulación en el citosol y la mitocondria que conduce a la activación de diversos eventos intracelulares y que eventualmente resultan en la muerte celular (Choi, 1988; Choi, 1995).

La isquemia cerebral dispara una serie compleja de mecanismos bioquímicos y moleculares que dañan la función neurológica a través de un desajuste en la integridad celular principalmente modulada por la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la inflamación.

Un elemento importante en el estudio de la fisiopatología y farmacología de los ACV es el uso de modelos animales adecuados; los modelos más comunes se desarrollaron en roedores, para la elección apropiada de un modelo debe considerarse el mecanismo de inducción del daño, la intensidad del estímulo, el tiempo durante el cual se da dicho proceso, entre otros. Su menor costo económico, la facilidad de su manejo y de su monitorización fisiológica, justifican, en parte, la elección de estos animales frente a otros modelos llevados a cabo en otras especies animales (Ginsberg, 1996). Además, el grado de homología genética (Rabin y cols., 1986), así como las similitudes (en lo básico) en la anatomía, fisiología y reactividad de la vasculatura cerebral entre roedores y humanos (Purves, 1972), apoyan también la elección de estos modelos.

SEÑALIZACIÓN CELULAR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

Generalidades

Las señales externas son específicamente reconocidas por receptores que las transducen en una cadena de señalización intracelular. Las vías de señalización intracelular controlan todas las funciones de la célula así como el metabolismo intermediario, la división celular, la morfología, hasta los programas de muerte, todos estos eventos se encuentran asociados a cambios en el programa de expresión génica (Krauss, 2008). La transducción de señales intracelulares se compone de elementos los cuales frecuentemente se modulan en una forma secuencial, en donde

un componente pasa la señal al próximo. La función clave en la señalización intracelular está determinada por proteínas que tienen la capacidad de reconocer de forma específica, así como de procesar y traducir señales. En ausencia de una señal los transductores existen en estado inactivo, y son múltiples los mecanismos que utilizan las células para activar proteínas de señalización, entre los principales mecanismos están:

- la unión de otras moléculas de señalización
- transiciones conformacionales
- modificaciones covalentes
- compartimentalización

Después de la activación, las proteínas de señalización deben ser desactivadas para terminar o atenuar la respuesta a la señal.

Daño Celular en la Isquemia

Los mecanismos involucrados en la muerte neuronal, por un evento isquémico son complejos y dependen de múltiples factores, incluyendo la severidad y la duración del daño. Los diferentes tipos de muerte celular que se han descrito son regulados por mecanismos de señalización intracelular muy diversos y que aún no se entienden completamente en la actualidad.

Mecanismos de neuroprotección

Por otra parte los organismos han desarrollado mecanismos que los protegen en contra del daño, para compensar o regenerar la función tisular (Lledo y col., 2006). Dentro de estos mecanismos se encuentra la tolerancia isquémica que está acompañada por cambios sustanciales en la expresión génica, este evento se puede establecer experimentalmente tras la inducción del pre-condicionamiento, el cual es un procedimiento en el que se aplica un estímulo cercano pero por debajo del umbral de daño a un tejido; poco tiempo después de este estímulo el órgano y por lo tanto el organismo, desarrollan resistencia a, o tolerancia de, el mismo estímulo, similar o aun diferente estímulo sugiriendo que el pre-condicionamiento estimula la re-programación genómica de las células que confieren citoprotección y sobrevivencia. La respuesta genómica después del pre-condicionamiento es una evidencia de lo complejo de los eventos de señalización en los diferentes tipos celulares del cerebro (Malhotra y col., 2006). La tolerancia inducida por pre-

condicionamiento isquémico cambia la expresión de genes involucrados en la supresión de las vías metabólicas, la respuesta inmune, la actividad de canales iónicos y la coagulación sanguínea.

La expresión génica se regula por factores de transcripción, por metilación del DNA, así como por cambios bioquímicos en las histonas, lo cual modifica la estructura de la cromatina, controlando el acceso del aparato transcripcional en los sitios de iniciación (Stenzel-Poore y col., 2007; Ren y col., 2008).

La tolerancia isquémica se ha evaluado en diversos modelos animales particularmente en rata y gerbo (Barone y col., 1998; Heurteaux y col., 1993; Kirino y col., 1991). Bajo condiciones de pre-condicionamiento se ha evidenciado experimentalmente, que se activan mecanismos protectores que evitan el desarrollo de fenómenos fisiopatológicos desencadenados por un evento isquémico severo (Dirnagl y col., 2009). La tolerancia isquémica adquirida por los métodos de pre-condicionamiento se ha explicado en base a que estos métodos inducen la activación mecanismos de recuperación en las células vulnerables. El establecimiento de la tolerancia isquémica requiere de varios días, particularmente por el hecho de que este involucra la síntesis de nuevas proteínas (Kato y col., 1989; Shoeniger y col., 1994). Algunas proteínas asociadas al establecimiento de la tolerancia, son proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 y HSP (por sus siglas en inglés proteínas de shock térmico, respectivamente), reguladores de factores de transcripción como el factor inducible de hipoxia (HIF), entre otros (Ruscher y col., 1998).

Uno de los mediadores más importantes de la respuesta celular y molecular a la hipoxia y a la isquemia de diversos órganos incluyendo al cerebro, que se expresa durante el pre-condicionamiento isquémico, es el HIF (Fandrey y col., 2006). El HIF es un factor de transcripción heterodimérico, formado por las subunidades α y β , esta última se expresa constitutivamente, mientras que la subunidad α se expresa en función de cambios en la presión parcial de oxígeno y que degrada por ubiquitinación. La actividad de HIF se asocia a la regulación de la transcripción de cerca de 100 genes, estos genes codifican la expresión de factores tróficos y citocinas las cuales se involucran en el transporte de oxígeno, angiogénesis, control vaso motor, sobrevivencia celular, regulación del pH y metabolismo energético (Fandrey y col., 2006; Sun et al 2003).

Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos son proteínas que promueven la sobrevivencia y la diferenciación de ciertas poblaciones neuronales, regulan el proceso de formación y establecimiento de las conexiones sinápticas, y además, regulan la expresión génica a través de su interacción con receptores celulares específicos (Huang y Reichardt, 2001). Los factores neurotróficos juegan un papel muy importante durante el desarrollo, controlan el proceso de muerte celular programada y regulan el número final de neuronas y conexiones del sistema nervioso. Además, diferentes estudios demuestran que los factores neurotróficos pueden proteger a las neuronas frente a estímulos de muerte, estos efectos neuroprotectores han sido demostrados en numerosos modelos animales de trastornos neurológicos como la isquemia (Holtzman y col., 1996). Se ha descrito una gran variedad de factores tróficos con distintas funciones, que se agrupan principalmente en neurotrofinas y citocinas.

Las neurotrofinas son la familia de factores tróficos mejor estudiada, está compuesta por NGF (del inglés, *Nerve Growth Factor*), BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*), NT-3 y NT-4/5 (del inglés, *neurotrophin-3* y *neurotrophin-4/5*, respectivamente). Inicialmente se sintetizan como precursores o pro-neurotrofinas, las cuales deben ser sometidas a proteólisis para convertirse en neurotrofinas maduras (Mowla y col., 2001). Su mecanismo de acción como señalizador extracelular es a través de la interacción con dos tipos diferentes de receptores de membrana, el receptor p75-NTR (del inglés, *p75-neurotrophin receptor*), y los receptores Trk (del inglés, *Thyrosin-related kinase*), de la familia de tirosina cinasas. Estos receptores suelen presentarse en la misma célula, coordinan y modulan la respuesta de las neuronas a las neurotrofinas (Miller y Kaplan, 2001). Las diferentes neurotrofinas se unen de manera específica a los receptores Trk: NGF se une preferentemente a Trk-A, BDNF y NT-4/5 a Trk-B, y NT-3 a Trk-C. Entre las vías de señalización que se activan por receptores Trk en respuesta a neurotrofinas está la vía de MAPK (del inglés *Mitogen-activated protein kinase*), la de AKT (*serin/threonine protein kinase*) y la de PKC (del inglés *protein kinase C*).

La eritropoyetina (EPO) es una citocina que incrementa su expresión después de un evento isquémico es una glucoproteína de 30.4 KDa, en donde aproximadamente la mitad de su peso molecular se deriva de los carbohidratos asociados (Maiese y col.,

2005), la EPO contiene 4 cadenas glucosiladas que incluyen tres cadenas ligadas al N y un oligosacárido ligado al O; la producción y secreción de la EPO madura, también depende de la integridad de las cadenas de oligosacáridos, además estas cadenas son fundamentales para la actividad biológica de la EPO y pueden protegerla de la degradación por radicales libres de oxígeno. Por otra parte la actividad de la EPO depende de dos uniones di-sulfuro, formadas entre cisteínas, mientras que la alquilación de los grupos sulfhidrilo resulta en la pérdida irreversible de la actividad biológica de la EPO (Maiese y col 2005).

El receptor a EPO (R-EPO) forma parte de la familia de receptores a citocinas tipo I, y se activa tras la homodimerización (Watowich y col., 1994). La interacción de la EPO con su receptor en las células progenitoras eritroides, regula la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de estas células; el R-EPO también se expresa en numerosas líneas celulares no-eritroides durante diferentes etapas prenatales y posnatales, que incluyen células constitutivas del sistema nervioso tales como; neuronas, microglía, astrocitos y células endoteliales vasculares (CEV) (Anagnostou y col., 1994; Fliser y Haller 2007; Genc y col., 2004), lo que ha permitido evaluar su función durante el desarrollo y sugerir un papel potencial en la neuroprotección.

Durante el desarrollo de un organismo, la producción de EPO y su receptor se alteran. Así, la expresión del R-EPO se eleva de manera importante durante el desarrollo embrionario, casi en los mismos niveles a los que se observan en la médula ósea en adultos, después del nacimiento los niveles de R-EPO se reducen significativamente a lo largo del proceso de maduración cerebral (Liu y col., 1997). Por otra parte, se ha reportado que la reducción en la disponibilidad de oxígeno para los tejidos, se traduce en un incremento en la expresión de EPO y su receptor, no solo en órganos periféricos (Fliser y Haller, 2007; Li y col., 2004,) sino también en el cerebro (Li y col., 2007).

Entre los eventos moleculares neurotróficos y neuroprotectores, asociados a la señalización por EPO, están los cambios en los niveles de expresión del complejo EPO/R-EPO particularmente en áreas que presentan susceptibilidad neuronal al evento isquémico, tal como el hipocampo y la corteza cerebral, así como la regulación de su expresión durante el desarrollo fetal. En 1993, Konishi y col., reportaron los efectos tróficos de la EPO, en cultivos embrionarios de neuronas

colinérgicas, promoviendo la diferenciación. Similarmente, Masuda y col., describieron la existencia de un R-EPO funcional en líneas celulares clonadas de tipo neural (PC12) y SN6. Varios estudios han mostrado que EPO tiene efectos neuroprotectores tanto en modelos de isquemia cerebral como de excitotoxicidad por glutamato (Morishida y col., 1997). Además se observó la expresión de R-EPO en células endoteliales, microglía y astrocitos de manera temporal, después de inducir la expresión de EPO en un modelo de isquemia cerebral focal, en ratones (Bernaudin y col., 1999), lo que promueve la señalización mediada por EPO y la activación de mecanismos de protección para minimizar el volumen del área dañada. La EPO puede proteger a las neuronas por dos mecanismos, uno directo y otro indirecto; la vía directa involucra la inhibición de la apoptosis que se presenta por hipoxia/isquemia, mientras que la indirecta se debe a la neo-vascularización. Entre las vías de señalización que se asocian a la neuroprotección después de un evento isquémico y que se regulan por factores extrínsecos se encuentran la vía AKT y ERK (MAPK).

Vía de Señalización Mediada por AKT

La proteína serina/treonina cinasa AKT, también conocida como proteín-cinasa B (PKB), fue inicialmente descrita por tres grupos diferentes, con base en su homología a la proteín-cinasa A (PKA; Coffey y Woodgett, 1991), a la proteín-cinasa C (PKC; Jones y col., 1991a), y como un homólogo celular del oncogen retroviral akt (v-Akt; Bellacosa y col., 1991). La AKT están constituida por una estructura conservada que se compone de un dominio amino terminal denominado dominio de homología a pleckstrina (PH, del inglés *pleckstrin homology*), un dominio central, donde reside la actividad cinasa, y un dominio carboxilo terminal, que funciona como dominio regulador (Song y col., 2005). Su actividad viene determinada por dos sitios de fosforilación en la treonina 308 (Thr308), que se localiza en el dominio cinasa, y en la serina 473 (Ser473), que se encuentra en el dominio regulador. Entre las funciones celulares a las que se asocia su actividad está la de regular la proliferación y la sobrevivencia celular (Brazil y Hemmings, 2001; Alessi y col., 1996).

La activación de AKT por factores tróficos depende de la proteína PI3-K (Burgering y Coffey, 1995; Franke y col., 1995; Kohn y col., 1995). Cuando el factor trófico se une

específicamente a su receptor, la PI3-K se recluta, tras su activación, la subunidad catalítica de la PI3-K fosforila el glicerofosfolípido de membrana PI-4,5-P2 (del inglés *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*) produciendo PIP3 (del inglés *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) y PIP2 (del inglés *phosphatidylinositol 3,4,-biphosphate*) en la membrana citoplasmática interna (Chong y col., 2005). PIP3 actúa como segundo mensajero, y sus niveles están regulados de forma precisa por la acción de fosfatasas como la PTEN (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*; Simpson y Parsons, 2001). AKT no se activa directamente por PIP3, pero se recluta en la membrana plasmática por la alta afinidad de su dominio PH hacia el PIP3, una vez en la membrana se altera su conformación lo que permite su posterior fosforilación (Andjelkovic y col., 1997).

La activación final de la vía de AKT promueve la señalización de supervivencia que les permite inhibir diferentes estímulos apoptóticos (Yao y Cooper, 1995). Sus efectos anti-apoptóticos pueden deberse a tres mecanismos distintos: (1) inhibición directa de la vía apoptótica, (2) regulación de la transcripción de genes asociados a la supervivencia celular y (3) regulación del metabolismo celular (Song y col., 2005). En lo que respecta a la regulación directa, AKT puede fosforilar diferentes miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 como Bad (Datta y col., 1997) y Bim (Qi y col., 2006). Una vez fosforiladas por AKT, se produce su unión a las chaperonas 14-3-3 en el citoplasma, con lo que se inhibe su efecto pro-apoptótico. Otros efectos directos sobre la vía apoptótica conllevan la inactivación por fosforilación de la caspasa-9 (Cardone y col., 1998), o la regulación negativa de SAPK/JNK (Paradis y Ruvkun, 1998; Kim y col., 2001; Barthwal y col., 2003).

Respecto al control transcripcional, AKT puede fosforilar diferentes factores de transcripción que modulan su actividad. La fosforilación de la familia de factores de transcripción FoxO, entre cuyas funciones se encuentra la inducción de la apoptosis, produce una redistribución celular de estos factores desde el núcleo hasta el citoplasma causando una inhibición de su actividad (Brunet y col., 1999). La inactivación mediante la fosforilación por AKT sobre los factores pro-apoptóticos p53 y p73 también ha sido descrita. Esta regulación ocurre de manera indirecta, mediante la fosforilación de las proteínas Mdm2 (del inglés *Murine double minute 2*), en el caso de p53 (Gottlieb y col., 2002), y de la proteína YAP (del inglés *yes-*

associated protein), en el caso de p73 (Basu y col., 2003). A diferencia de los anteriores, la fosforilación de AKT sobre los factores CREB (del inglés *cyclin AMP-response element binding*) y NF-kB puede inducir la expresión de diferentes genes anti-apoptóticos (Barkett y Gilmore, 1999; Wang y col., 1999). La fosforilación mediante AKT, induce un aumento en la expresión de ambos factores de transcripción, actuando directamente sobre CREB (Du y Montminy, 1998), e indirectamente sobre NF-kB al inhibir a la cinasa INB que lo regula negativamente (Kane y col., 1999).

Por último, los efectos de AKT sobre la sobrevivencia celular podrían estar relacionados con sus efectos sobre el metabolismo. AKT es capaz de fosforilar e inhibir a la enzima GSK3 β (del inglés *glycogen synthase kinase 3 beta*) promueve la acumulación de glucógeno (Cross y col., 1995). Esta inhibición de GSK3 β es capaz de inhibir la apoptosis bajo diversas circunstancias (Pap y Cooper, 1998).

La activación de la vía de PI3-K/AKT por factores tróficos y sus efectos sobre la sobrevivencia se han demostrado en varias poblaciones neuronales, como las corticales (Yamada y col., 1997, 2001; Hetman y col., 1999) e hipocampales (Righi y col., 2000), en las cuales se ha probado que la activación de AKT se induce sustancialmente en respuesta a estrés celular, después de estímulos agudos de tipo isquémico (Jin y col., 2000; Sakurai y col., 2001).

Vía de Señalización ERK/MAPK

La vía de ERK/MAPK forma parte de la familia de las MAPKs junto a otras dos subfamilias, la vía de SAPK/JNK y la vía de p38 (Schaeffer y Weber, 1999). Esta vía es una de las más conservadas a lo largo de la evolución y, a diferencia de las otras dos subfamilias que son principalmente inductoras de apoptosis (Xia y col., 1995), ésta participa en el control de diferentes procesos celulares fundamentales, incluyendo proliferación celular, sobrevivencia, diferenciación y metabolismo (O'Neill y Kolch, 2004; Wellbrock y col., 2004).

La vía de ERK/MAPK más caracterizada es la cascada de Ras-Raf-MEK (del inglés *MAPK and ERK kinase*)-ERK/MAPK. Diferentes receptores anclados en la membrana, como los específicos para factores tróficos, inducen la activación de Ras, una proteína con actividad GTP-asa que se une y recluta de forma específica a las cinasas Raf hacia la membrana celular para su posterior activación. La vía comprende la

fosforilación de ERK1 y ERK2 (ERK1/2). Este sistema de triple cascada de cinasa dota al sistema de una gran amplificación de la señal inicial. Una vez que se fosforila en los sitios Thr202 y Tyr204, una gran proporción de ERK1/2 se acumula en el núcleo (Chen y col., 1992; González y col., 1993; Lenormand y col., 1993), donde regula la transcripción de varios genes dando lugar a una respuesta inmediata. Se ha observado que c-Jun, c-Fos, c-Myc, c-Myb, Elk y CREB son sustratos fosforilables por la vía de ERK/MAPK (Davis, 1995; Gille y col., 1995; Grewal y col., 1999; Vanhoutte y col., 1999). La vía de la ERK/MAPK puede regularse también por neurotransmisores. Se ha observado un incremento en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la estimulación glutamatérgica (Wang y col., 2004). Los agonistas del receptor NMDA (del inglés *N-methyl-D-aspartate*) activan la vía de la ERK/MAPK (Sgambato y col., 1998; Mao y col., 2004) probablemente a través de un mecanismo que implica una serie de cinasas sensibles al calcio (Perkinton y col., 1999, 2002).

Varios estudios demuestran que la activación de la vía ERK/MAPK regula la sobrevivencia celular (Parrizas y col., 1997; Feng y col., 1999; Hetman y col., 1999; Chaib-Oukadour y col., 2004). Entre otras funciones, esta cinasa puede fosforilar directamente a proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bad (Scheid y col., 1999) y Bim (Biswas y Greene, 2002), inhibiendo su actividad. También se ha descrito que su activación participa en fenómenos de neuroprotección por factores tróficos (Hetman y col., 1999; Han y Holtzman, 2000; Rossler y col., 2004; Wu y col., 2004; Leeds y col., 2005).

Vía de señalización mediada por el factor de transcripción STAT5.

Las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT) son un grupo de factores de transcripción. Hasta ahora se han descrito siete miembros: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6. Cada proteína STAT tiene tres dominios principales, uno de ellos es el unión al ADN, el segundo dominio es el homólogo-src (SH2) para la dimerización y el último es un residuo de tirosina conservado el cual puede ser fosforilado por la proteína cinasa *Janus*. Este grupo de factores de transcripción responden rápidamente al estímulo, una vez activada por fosforilación se dimerizan y translocan al núcleo, sin requerir la síntesis de segundos mensajeros (Aaronson y Horvath, 2002). La función clásica de STAT es de mediar la vía de señalización de citocinas y factores de crecimiento. Se ha reportado que algunos de los miembros de

STAT, pueden regular los procesos de apoptosis (Battle y Frank, 2002). Mientras que otros STAT pueden mediar señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas dependiendo de las condiciones del estímulo desencadenante de la respuesta celular, STAT5, en particular, se le asocia con señales a favor de la sobrevivencia celular (Debierre-Grockiego, 2004).

STAT5 se fosforila en el residuo de tirosina 694 por la cinasa *Janus* (JAK2), lo que le confiere la capacidad de translocación al núcleo y las características en cuanto estructura molecular para su unión a secuencias específicas del ADN, en los sitios promotores de genes de expresión temprana que a su vez modifican la expresión de otros (Paukku y Silvennoinen, 2004). STAT5 se le reconoció originalmente como un factor de transcripción que regula el gen de la β -caseína en respuesta a la prolactina, pero también se activa por varias citocinas y factores de crecimiento, como la EPO e interleucinas (Gobert y col., 1996, Debierre-Grockiego, 2004). Se ha reportado que STAT5 tiene un importante papel anti-apoptótico en el tejido cardiaco, después de la inducción de un evento de isquemia cardiaca (Yamaura y col., 2003), en células endoteliales después de hipoxia (Dudley y col., 2005), en la sobrevivencia de células hematopoyéticas (Battle y Frank, 2002) y en células SH-SY5Y derivadas del neuroblastoma (Um y Lodish, 2006). Los productos finales de la señalización de STAT5 que se relacionan con la regulación de la apoptosis incluye Bcl-xL (Socolovsky y col., 1999) y XIAP (Mohapatra y col., 2003). Tanto Bcl-xL y XIAP han demostrado efectos anti-apoptóticos en modelos de isquemia cerebral (Zhang y col., 2004). La EPO se ha demostrado que puede promover la fosforilación y activación de STAT5 a través de JAK2 (Sola y col., 2005). Seguida de la isquemia cerebral, la apoptosis es un importante mecanismo de muerte celular, principalmente en neuronas de CA1 del hipocampo inducidas por isquemia global, a través de la activación de la vía de señalización STAT5 mediada por EPO (Zhang y col., 2004).

El estudio de los mecanismos de señalización requiere de esfuerzos sumados desde diferentes puntos de vista, para diseñar estrategias terapéuticas orientadas hacia la neuroprotección altamente eficientes, para evitar así, el desencadenamiento de las manifestaciones clínicas asociadas a la muerte neuronal, en diferentes patologías.

Agradecimientos

El trabajo ha sido financiado por el Comité Técnico del Fideicomiso UDG/PROMEPE, programa de exbecarios según oficio 103.5/05/828.

REFERENCIAS

1. Aaronson DS, Horvath CM. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653– 1655.
2. Alcaraz-Zubeldia M y Ríos CC. (2004). Isquemia cerebral. *Temas de Neurociencias*. III: 1-11.
3. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 15(23):6541-51.
4. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. (1994) Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*;91:3974–3978.
5. Andjelković M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*. 272(50):31515-24.
6. Barone GW, Webb JW, Hudec WA. (1998) An improved retractor for the anterior approach in the surgical management of vertebral fractures. *Am J Orthop* 27(10):703-4.
7. Barthwal MK, Sathyanarayana P, Kundu CN, Rana B, Pradeep A, Sharma C, Woodgett JR, Rana A. (2003) Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *J Biol Chem*. 278(6):3897-902.
8. Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2003 Jan;11(1):11-23.
9. Battle TE, Frank DA (2002). The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med*; 2:381–392.
10. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*. 11;254(5029):274-7.
11. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999 Jun;19(6):643-51.
12. Biswas SC, Greene LA. Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2002 Dec 20;277(51):49511-6.
13. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001 Nov;26(11):657-64.
14. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999 Mar 19;96(6):857-68.
15. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995 Aug 17;376(6541):599-602.
16. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998 Nov 3;282(5392):1318-21.
17. Chaïb-Oukadour I, Gil C, Aguilera J. The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurochem*. 2004 Sep;90(5):1227-36.
18. Choi DW. (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.
19. Choi DW. (1995). Calcium: still center stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18:58-60.
20. Chong ZZ, Lin SH, Li F, Maiese K. The sirtuin inhibitor nicotinamide enhances neuronal cell survival during acute anoxic injury through AKT, BAD, PARP, and mitochondrial associated "anti-apoptotic" pathways. *Curr Neurovasc Res*. 2005 Oct;2(4):271-85.

21. Coffey PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem.* 1991 Oct 15;201(2):475-8.
22. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.
23. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997 ;91(2):231-41.
24. Debierre-Grockiego F. Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. *Apoptosis* 2004;9:717-728.
25. Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol.* 2009 Apr;8(4):398-412.
26. Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem.* 1998 Dec 4;273(49):32377-9.
27. Dudley AC, Thomas D, Best J, Jenkins A. A VEGF/JAK2/STAT5 axis may partially mediate endothelial cell tolerance to hypoxia. *Biochem J* 2005;390:427-436.
28. *EMBO J.* 2006 Jan 11;25(1):58-69.
29. Dugan LL, y Choi DW. (1999). Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. En: *Basic Neurochemistry*. Editores: Siegel JG, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. ED. Lippincott-Raven Press, PH. Pp 711-729.
30. Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M. (2006). Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res.* Sep 1;71(4):642-51.
31. Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol.* 1999 Dec 15;163(12):6403-12.
32. Feigin V, Anderson N, Gunn A, Rodgers A, Anderson C. The emerging role of therapeutic hypothermia in acute stroke. *Lancet Neurol.* 2003 Sep;2(9):529.
33. Fliser D, Haller H. Erythropoietin and treatment of non-anemic conditions--cardiovascular protection. *Semin Hematol* (2007);44:212-217.
34. Genc S, Koroglu TF, Genc K. (2004). Erythropoietin as a novel neuroprotectant. *Restor Neurol Neurosci.*; 22:105-119
35. Ginsberg MD (1997). The new language of cerebral ischemia. *AJNR Am J Neuroradiol* 18:1435-45.
36. González AS, Kostine A, Gómez-Flores JR, y col. Non-invasive assessment of endothelial function. Intra and inter-observer variability. *Arch Cardiol Mex.* 2006 Oct-Dec;76(4):397-400.
37. Gobert S, Chretien S, Gouilleux F, y col. Identification of tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor crucial for STAT5 activation. *Embo J* 1996;15:2434-2441.
38. Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 2002 Feb 14;21(8):1299-303.
39. Grewal SS, York RD, Stork PJ. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 1999 Oct;9(5):544-53.
40. Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1999 Aug 6;274(32):22569-80.
41. Heurteaux C, Bertaina V, Widmann C, Lazdunski M. K⁺ channel openers prevent global ischemia-induced expression of c-fos, c-jun, heat shock protein, and amyloid beta-protein precursor genes and neuronal death in rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 15;90(20):9431-5.
42. Holtzman J, Caldwell M, Walvatne C, Kane R. Long-term functional status and quality of life after lower extremity revascularization. *J Vasc Surg.* 1999 Mar;29(3):395-402.
43. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
44. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol.* 1999 Jun 3;9(11):601-4.
45. Kato R, Araki T, Kogure K, Murakami M, y Uemura K. (1990). Sequential cerebral blood flow changes in short-term cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 21: 1346 -1349.
46. Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991 Mar;11(2):299-307.

47. Konishi T, Fukata M, Takeda M, Matsuzaki K. As originally published in 1993: preoperative use of erythropoietin for cardiovascular operations in anemia. Updated in 2001. *Ann Thorac Surg*. 2001 May;71(5):1734-5.
48. Krauss Gerhard. *Basics of Cell Signaling*. 4th Edition, Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. 2008 WILEY-VCH Verlag GMBH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-31397-6
49. Leeds P, Leng Y, Chalecka-Franaszek E, Chuang DM. Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons. *Neurochem Int*. 2005 Jan;46(1):61-72.
50. Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Mar;7(3):179-93. Review.
51. Lenormand P, Sardet C, Pagès G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol*. 1993 Sep;122(5):1079-88.
52. Li F, Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin on a Tightrope: Balancing Neuronal and Vascular Protection between Intrinsic and Extrinsic Pathways. *Neurosignals* 2004a;13:265-289.
53. Li Y, Lu Z, Keogh CL, Yu SP, Wei L. Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:1043-1054.
54. Liu C, Shen K, Liu Z, Noguchi CT. Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem* 1997;272:32395-32400.
55. Mao L, Tang Q, Samdani S, Liu Z, Wang JQ. Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. *Eur J Neurosci*. 2004 Mar;19(5):1207-16.
56. Maiese K, Li F, Chong ZZ. (2005). New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA*. Jan 5;293(1):90-5.
57. Mehta A, Sekhon CPS, Giri S, Orak JK y Singh AK. (2002). Attenuation of ischemia/reperfusion induced MAP kinases by N-acetyl cysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 240: 19-29.
58. Miller FD, Kaplan DR. On Trk for retrograde signaling. *Neuron*. 2001 Dec 6;32(5):767-70.
59. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):12660-6.
60. Mohapatra S, Chu B, Wei S, Djeu J, Epling-Burnette PK, Loughran T, Jove R, Pledger WJ. Roscovitine inhibits STAT5 activity and induces apoptosis in the human leukemia virus type 1-transformed cell line MT-2. *Cancer Res* 2003;63:8523-8530.
61. Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):19929-32.
62. Paukku K, Silvennoinen O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:435-455.
63. Perkinton MS, Ip JK, Wood GL, Crossthwaite AJ, Williams RJ. Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones. *J Neurochem*. 2002 Jan;80(2):239-54.
64. Perkinton MS, Sihra TS, Williams RJ. Ca(2+)-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J Neurosci*. 1999 Jul 15;19(14):5861-74.
65. Purves MJ. The physiology of the cerebral circulation. *Monogr Physiol Soc*. 1972;(28):1-414.
66. Qi XJ, Wildey GM, Howe PH. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):813-23. Epub 2005 Nov 10.
67. Rabin M, Ferguson-Smith A, Hart CP, Ruddle FH. Cognate homeo-box loci mapped on homologous human and mouse chromosomes.
68. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Dec;83(23):9104-8.
69. Ren C, Gao X, Steinberg GK, Zhao H. Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. *Neuroscience* 2008;151:1099-103.
70. Righi M, Tongiorgi E, Cattaneo A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *J Neurosci*. 2000 May 1;20(9):3165-74.

71. Rosamond W, Flegal K, Friday G, y col. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2007 Feb 6;115(5):e69-171.
72. Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, (1998). Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 1;254:117-20.
73. Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Itoyama Y, Tabayashi K. Induction of phosphatidylinositol 3-kinase and serine-threonine kinase-like immunoreactivity in rabbit spinal cord after transient ischemia. *Neurosci Lett*. 2001 Apr 13;302(1):17-20.
74. Scheid MP, Schubert KM, Duronio V. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem*. 1999 Oct 22;274(43):31108-13.
75. Sgambato V, Pagès C, Rogard M, Besson MJ, Caboche J. extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. *J Neurosci*. 1998 Nov 1;18(21):8814-25.
76. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10;264(1):29-41
77. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999;98:181-191.
78. Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T, Wen TC. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res* 2005;57:481-487.
79. Song K, Wang H, Krebs TL, Danielpour D. Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-beta/ALK5-mediated Smad3 activation. *EMBO J*. 2006 Jan 11;25(1):58-69.
80. Stenzel-Poore MP, Stevens SL, King JS, Simon RP. Preconditioning reprograms the response to ischemic injury and primes the emergence of unique endogenous neuroprotective phenotypes: a speculative synthesis. *Stroke*. 2007 Feb;38(2 Suppl):680-5.
81. Um M, Lodish HF. Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways. *J Biol Chem* 2006;281:5648-5656.
82. Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pagès C, Besson MJ, Hipskind RA, Caboche J. Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol*. 1999 Jan;19(1):136-46.
83. Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol*. 1999 Sep;19(9):6195-206.
84. Wang JQ, Tang Q, Parelkar NK, Liu Z, Samdani S, Choe ES, Yang L, Mao L. Glutamate signaling to Ras-MAPK in striatal neurons: mechanisms for inducible gene expression and plasticity. *Mol Neurobiol*. 2004 Feb;29(1):1-14
85. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Nov;5(11):875-85.
86. Wu X, Zhu D, Jiang X, Okagaki P, Mearow K, Zhu G, McCall S, Banaudha K, Lipsky RH, Marini AM. AMPA protects cultured neurons against glutamate excitotoxicity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation in extracellular signal-regulated kinase to upregulate BDNF gene expression. *J Neurochem*. 2004 Aug;90(4):807-18.
87. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*; 270(5240):1326-31.
88. Yamaura G, Turoczi T, Yamamoto F, Siddiqui MA, Maulik N, Das DK. (2003) STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H476-482.
89. Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*. 1995 Mar 31;267(5206):2003-6.
90. Zhang F, Yin W, Chen J. Apoptosis in cerebral ischemia: executional and regulatory signaling mechanisms. *Neurol Res* 2004;26:835-845.

ASPECTOS CLÍNICOS DE LA HIPOXIA CEREBRAL

¹Czornyj L, ^{2,3}Lazarowski A.

¹Servicio de Neurología, Hospital Nacional de Pediatría "Prof. Juan P. Garrahan", y Sociedad Argentina de Neurología Infantil (SANI), Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Investigaciones en Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Y ³Instituto de Investigaciones de Biología Celular y Neurociencias (IBCN), Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La hipoxia cerebral, ya sea como hipoxia global, o bien como Accidente Cerebrovascular (ACV) focal o stroke, es un trastorno neurológico severo de características heterogéneas y múltiples etiologías, que representa la segunda causa de muerte y la enfermedad con mayor secuelas de discapacidad en el mundo (1, 2). Cerca del 10% de las muertes se deben a este trastorno, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) pudo determinar, que alrededor de 270.000 muertes se produjeron en el año 2002 en los países latinoamericanos por este motivo (3).



Figura 1. Frecuencia de muertes secundarias a AVC (adultos) en países latinoamericanos (OMS-2002).

Las causas de este trastorno abarcan un amplio conjunto de síndromes clínicos que incluyen afecciones cardíacas, arterioesclerosis, hipertensión, enfermedad de los pequeños vasos penetrantes en el SNC, o trastornos genéticos, que a su vez pueden estar agravados por factores adicionales como el tabaquismo, la diabetes, la falta de ejercicio, etc. Todas estas diferentes situaciones desembocan en la reducción en el aporte de O_2 en el SNC, debido a una disminución en la velocidad del flujo sanguíneo o **isquemia**, del griego “*isceiu*” (FRENO) + “*aima*” (SANGRE). El concepto de **isquemia**, inicialmente descrito por Virchow R. en 1858, resulta de un desbalance entre la demanda tisular de O_2 y el flujo sanguíneo (4) y es la consecuencia de múltiples mecanismos que actuarán en las diferentes etapas esquematizadas en la Figura 2, donde la consecuencia inicial es: **un menor aporte de O_2 en el parénquima cerebral con pérdida en el rendimiento energético dependiente del metabolismo aeróbico mitocondrial** (5).

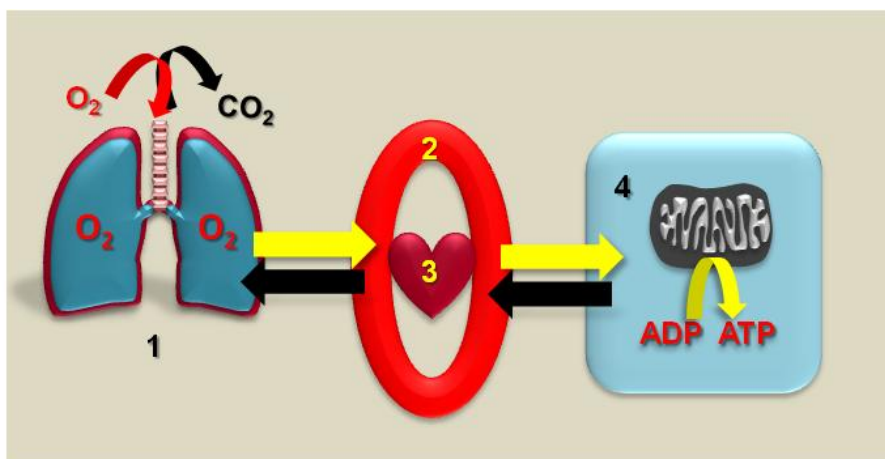


Figura 2. 1) Hipoxia-Hipóxica, producida ya sea por falta de O_2 como en la asfixia o la altura o bien por una capacidad de ventilación disminuida observada en las patologías pulmonares. **2) Hipoxia Anémica**, debida a la disminución de la concentración de hemoglobina. **3) Hipoxia por estasis**, debido a insuficiencia cardíaca. **4) Hipoxia Isquémica**: debida a una obstrucción vascular que reduce el O_2 tisular, o por alteraciones metabólicas (o tóxicas) que impiden el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial en dicho tejido.

En condiciones normales, las neuronas mantienen el control de la neurotransmisión mediante sistemas de transporte activo que regulan las influencias del medio circundante y previenen el influjo de Ca^{2+} y otros iones que ejercerían fuertes efectos citotóxicos sobre ellas.

La isquemia aguda induce una importante cascada de eventos moleculares dependientes tanto del tiempo de la duración del insulto, como del tiempo de progresión de sus efectos inmediatos y consecuencias a largo plazo. Estos mecanismos, básicamente se inician en forma inmediata como respuesta a la privación energética, y pueden inducir neurotoxicidad por sobre-estimulación de los receptores glutamatergicos, excesiva acumulación intracelular de Na^+ y Ca^{2+} , daño mitocondrial y finalmente la apoptosis neuronal. El desenlace, puede ser muy rápido en los grupos celulares más afectados, pero una despolarización progresiva seguida de inflamación y muerte apoptótica, se producirá en el curso de las horas y días consecutivos al episodio isquémico (6) (Figura 3).

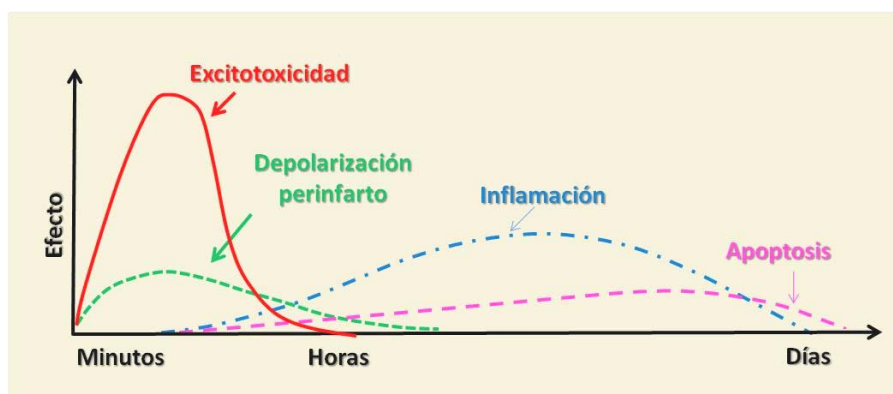


Figura 3. Evolución en el tiempo de la hipoxia-isquemia.

Las consecuencias de la hipoxia-isquemia cerebral, pueden ser entendidas como un fenómeno “traumático” sobre el SNC, que estará directamente ligada a la intensidad del insulto, su durabilidad y la región cerebral comprometida, cualquiera que sea la causa (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes causas de Hipoxia Cerebral

- *Sobredosis de drogas*
- *Presión arterial muy baja*
- *Sofocamiento*
- *Sufrimiento fetal*
- *Trastornos cardíacos*
- *Grandes alturas y/o Asfixia, o inhalación de humo-CO*
- *Compresión de la tráquea*
- *Complicaciones de la anestesia general*
- *Enfermedades que paralizan los músculos de la respiración*
- *ACV*

Según cuál sea la región cerebral comprometida, se observarán diferentes secuelas. Además, la discapacidad predominante se relacionará con las diferentes áreas cerebrales afectadas, generando secuelas con compromiso motor, del lenguaje, o visual, del entendimiento y/o comportamiento, o bien el área sensitiva, o cualquiera de sus combinaciones (7) (Tabla 2).

Tabla 2. Secuelas de la hipoxia cerebral

<i>En niños:</i>	Parálisis cerebral o enfermedad motriz cerebral (EMC) Retardo mental Compromiso neurosensorial Epilepsia secundaria Disfasias y/o disartrias
<i>En adultos:</i>	Hemiplejías Paraplejías Cuadriplejías Disfasias Trastornos cognitivos

ASPECTOS CLÍNICOS GENERALES DE LA HIPOXIA CEREBRAL

Síntomas

En los casos leves, la hipoxia causa sólo distracción, trastorno en el juicio y movimientos descoordinados; mientras que en los casos graves, se produce un estado de inconsciencia y falta de reacción total (coma), con supresión de los reflejos del tronco encefálico, incluyendo la respuesta a la luz y el reflejo de la respiración. Únicamente se mantienen la función cardíaca y la presión arterial y en caso de persistir, será inevitable la muerte cerebral. Si la falta de oxígeno en el cerebro está limitada a un período de tiempo muy breve, el coma puede ser reversible con niveles variables de retorno a la función, dependiendo de la magnitud de la lesión. Algunas veces, se presentan convulsiones que pueden ser continuas (estado epiléptico) (8).

Signos y exámenes complementarios

La hipoxia cerebral usualmente se puede sospechar a partir de una evaluación clínico-neurológica y cognitiva exhaustiva y una historia clínica que puntualice en los antecedentes y posibles factores de riesgo. El objetivo de los exámenes es determinar la causa y el territorio cerebral afectado por la hipoxia (8) (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios complementarios

- *Imágenes por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*
- *Electrocardiografía (ECG)*
- *Ecocardiografía*
- *Exámenes de sangre, incluyendo gasometría arterial y nivel de glucosa en la sangre*
- *Electroencefalografía (EEG): Necesario cuando se sospecha hiperactividad por convulsiones o pérdida de actividad por muerte cerebral*
- *Potenciales evocados*

Pronóstico

El pronóstico depende del grado de la lesión cerebral hipóxica, el cual se determina por el tiempo que el cerebro haya estado sin el suministro de oxígeno. La mayoría de los pacientes que tienen una recuperación completa experimentan un breve momento de inconsciencia. Cuanto más tiempo permanezca el paciente inconsciente, mayor será la posibilidad de que se presente la muerte o la muerte cerebral y menor la probabilidad de una recuperación significativa (8).

Complicaciones

Las complicaciones de la hipoxia cerebral pueden ser: estado vegetativo prolongado, en el cual se pueden preservar las funciones vitales básicas como la respiración, la presión arterial, el ciclo de sueño-vigilia y la capacidad de abrir los ojos, pero el paciente no está consciente ni responde al ambiente. El estado vegetativo prolongado generalmente va seguido de la muerte en menos de un año, aunque en raras ocasiones puede durar más. Otras complicaciones dependen del grado de la función neurológica e incluyen: infecciones pulmonares (neumonía), nutrición inadecuada, úlceras de decúbito y coágulos en las venas (trombosis venosa profunda), y neuropatías del paciente crítico (8).

HIPOXIA CEREBRAL INFANTIL

Aspectos clínicos más relevantes

Uno de cada 1.000 recién nacidos (RN) sufre hipoxia durante el parto, es decir, sufrimiento fetal causado por falta de oxígeno, hecho que les provoca lesiones cerebrales irreparables que en ocasiones pueden causar hasta la muerte. En estas circunstancias, las consecuencias clínicas de la hipoxia cerebral en el RN, dependerán del área del dañada. De esta forma, la hipoxia puede producir alteraciones en la

motricidad gruesa, la motricidad fina, el lenguaje, las funciones corticales superiores, la conducta psicosocial o varias de ellas simultáneamente (Figura 4). Así, el insulto hipóxico acorde al nivel de daño producido, genera una Encefalopatía Crónica NO Evolutiva, caracterizada por la posible presencia de uno o varios cuadros clínicos como: Parálisis Cerebral, trastornos de compromiso sensorial, retardo mental, o severas anomalías conductuales (TGD, Autismo; Síndrome de Asperger). La superposición de más de una de estas entidades, es relativamente frecuente, al igual que las epilepsias (secundarias a hipoxia) y las disfasias (Figura 4).

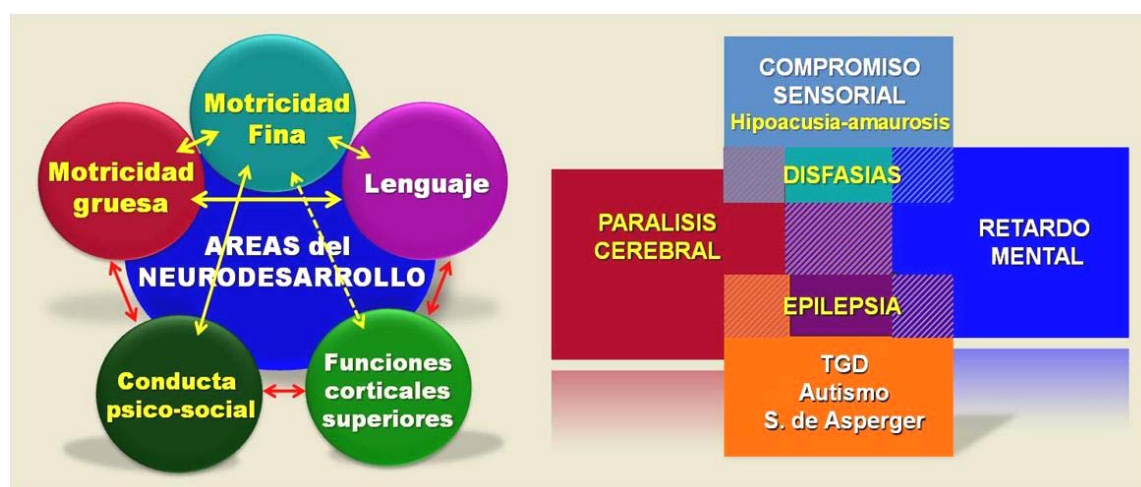


Figura 4. La hipoxia cerebral, puede afectar diferentes aspectos del Neurodesarrollo (izquierda), y generar síndromes clínicos con compromiso sensorial, conductual, retardo mental, trastorno motor (Parálisis Cerebral), y desarrollar además disfasias o epilepsias secundarias a la hipoxia. Más de una de estas anomalías y cuadros clínicos pueden superponerse.

Parálisis Cerebral (PC)

La hipoxia cerebral neonatal puede producirse por diferentes causas tales como anemia o enfermedad cardiopulmonar de la madre, insuficiente irrigación placentaria a causa de la hipotensión, anomalía en las contracciones uterinas, placenta previa, interrupción del flujo sanguíneo en la circulación del cordón umbilical, etc. Todas estas situaciones, provocan un cuadro de hipoxia prenatal severa que induce la muerte de gran número de neuronas fetales y eventualmente del feto. Si bien esta entidad clínica era conocida desde la antigüedad, su descripción etiopatogénica se inicia con el reporte de Little W. (9) en 1881, cuando relaciona en forma directa la espasticidad y el retardo mental con la asfixia neonatal y las

dificultades del parto. Una exhaustiva revisión de esta patología ha sido publicada por Legido y Katsetos (10), en la cual se enlistan diferentes entidades clínicas que manifiestan algún grado de espasticidad y merecen el término de PC, pero que no están vinculadas a trastornos obstétricos, ni a sufrimiento fetal por hipoxia. Por tal motivo, deberíamos considerar las PC prenatales, como secundarias a factores intrínsecos de tipo cromosómicos, poligénicos y genéticos, que si bien son excepcionales, ya se han reportado formas familiares de PC (descrito luego).

Las formas más comunes y prevalentes de PC, son las producidas tanto en el período perinatal como posnatal, y la más frecuente, es la encefalopatía hipóxica-isquémica ya mencionada. Sin embargo, trastornos vinculados a la prematuridad, infecciones, nutricionales, psicosociales y multifactoriales, pueden llevar al desarrollo de la Encefalopatía crónica no evolutiva o PC.

Durante el período postnatal, se verán alterados complejos procesos de la maduración y crecimiento del SNC, donde se afectará la arborización axonal y dendrítica, la sinaptogénesis, la síntesis proteica, la formación de espículas, y simultáneamente se activará la cascada de la apoptosis neuronal. Es relativamente común que en ciertos casos, estos procesos se acompañen de una detención en el crecimiento cefálico (microcefalia adquirida), que generalmente se asocia a retardo mental e hiperactividad. Desde el punto de vista clínico, la PC es una enfermedad persistente del movimiento y de la postura, provocada por una noxa que actúa en un momento puntual del neurodesarrollo, afectando al tracto córtico-espinal a nivel cerebral, dejando secuela permanente. Su incidencia es de 1,5 a 2,5 casos cada 1000 RN vivos. Si bien existen formas hipotónicas (5%), distónicas (5%), y atáxicas (5%), la forma más predominante de PC es la forma “espástica” (75%), en la cual predomina una hiperactividad del sistema Gamma, por déficit del control inhibitorio central debido a una lesión en la corteza motora o en las vías descendentes (Figura 5).

Clínicamente se caracteriza por predominio de la actividad de algunos grupos musculares, con deterioro muscular, disminución de la motilidad espontánea, exageración de los reflejos osteo-tendinosos y respuesta plantar extensora (Signo de Babinski positivo). Existen formas severas, moderadas y leves de PC y pueden caracterizarse según su “extensión” en tetraparéticas, paraparéticas, hemiparéticas, doble hemiparéticas o monoparéticas.

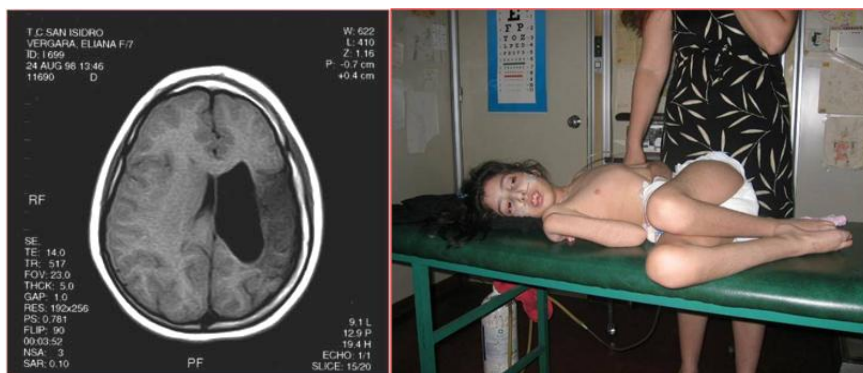


Figura 5. Lesión isquémica periventricular en hemisferio izquierdo, en una paciente con severo cuadro de hipertonicidad y espasticidad y RM moderado

Los estudios por neuroimágenes han mostrado sostenidamente que un 70-90% de los niños afectados poseen lesiones cerebrales, y facilitan la clasificación clínica en grupos: con malformaciones cerebrales tempranas o con alteraciones de la sustancia blanca, encefalopatías neonatales y un grupo heterogéneo de enfermedades adquiridas post-natalmente. Las lesiones de la sustancia blanca, que se pueden ver muy bien en la resonancia magnética nuclear convencional (RMN) es la principal causa de parálisis cerebral en niños nacidos pre-término. Alrededor del 20% de los lactantes con muy bajo peso al nacer tienen imágenes quísticas y alteraciones difusas de la sustancia blanca cerebral difusa denominada *leucomalacia periventricular*, con evidencia de patología asociada en otras estructuras corticales y subcorticales. En los lactantes nacidos a término con patología perinatal aguda, una variedad de imágenes en la RMN tienen utilidad diagnóstica (11). En general, cuando a la RMN convencional se agregan técnicas avanzadas, como las imágenes por difusión y la espectroscopía, se obtiene un cuadro más completo de las alteraciones estructurales. Los resultados han conducido a mejorar la comprensión de la patogénesis especialmente en lo que respecta a la *leucomalacia periventricular* y la encefalopatía hipoxi-isquémica. Esta información podría conducir a intervenciones tempranas, previniendo el daño cerebral en los lactantes pre-término y en los recién nacidos de término asfisiados. Muy recientemente se ha comunicado la terapia hipotérmica, durante las primeras 6 horas de vida del recién nacido hipóxico, como una manera de “frenar” el proceso de muerte neuronal secundario a la hipoxia con resultados favorables. De esta forma, la llamada “**hipotermia controlada**” (reduciendo la temperatura cerebral de 37.5°C a 33°C), detendría la destrucción neuronal evitando

la encefalopatía neonatal, enfermedad que manifiesta severos signos neurológicos durante las primeras 24 horas de vida y provoca un estado anatómico funcional anormal del SNC. Las consecuencias del daño producido, con severas secuelas motoras y/o intelectuales, son un verdadero desafío para la adecuada rehabilitación e inserción social de estos niños (12).

La Parálisis Cerebral, reconoce diferentes causas y mecanismos y puede responder a factores de riesgo: *Perinatales* (Prematuridad, Asfixia prenatal, Hiperbilirrubinemia, Infección perinatal) o bien a factores de riesgo *Prenatales* (hemorragia materna, toxemia, hipertiroidismo materno, corioamnionitis, infarto placentario, gemelaridad, exposición a toxinas, exposición a drogas, infección por TORCH, infección por VIH, infartos cerebrales arteriales y venosos, disgenesias cerebrales, etc.) o bien por los llamados factores genéticos que se describen a continuación. En tanto, las llamadas PC adquiridas, responden a su vez a una amplia gama de patologías tales como: meningitis, encefalitis, traumatismos y hemorragias intracraneales, infarto cerebral, hidrocefalia o tumores cerebrales (10), etc. Queda claro que la PC, es la denominación de un fenotipo clínico (mayoritariamente relacionado a la espasticidad) y que no necesariamente es secundario a un cuadro de hipoxia-isquemia, aunque ésta sea la causa predominante.

Formas familiares de PC

En los casos familiares de PC, se ha reconocido alta tasa de consanguineidad entre padres sanos. En la ataxia congénita con retardo mental (RM), el 30 al 50% de los casos presentan una alteración genética con herencia autosómica recesiva, y en pocos casos de diaplejía espástica, con herencia autosómica dominante (14). Las diferentes formas de herencia, ya sean autosómica dominante, recesiva o recesiva ligada al cromosoma X, han sido descritas en las formas familiares. En tres familias pudo reconocerse una forma poco común de PC espástica simétrica, con una transmisión autosómica recesiva, con localización génica en el cromosoma 2 (región 2q2425) y otros casos con una forma de una PC atáxica en la cual había un gen regulador en el cromosoma 9 (región 9p12q12) (10). Martínez et al. (15) describieron una familia con dos hermanos y un primo materno con diaplejía espástica, retraso mental y otros hallazgos (microcefalia, baja talla y criptorquidia),

en los que localizaron un defecto genético en la región pericentromérica del cromosoma X (Xp11.4q21) (16).

ACV PEDIÁTRICO

El accidente cerebrovascular (ACV) en pediatría es una patología mucho menos frecuente que la PC arriba descrita. Su incidencia es de 2,5 casos/100.000/año en edades entre 0-14 años. El ACV puede ser isquémico (arterial o venoso) o hemorrágico, y en cualquiera de los casos resultará en un déficit neurológico focal y agudo por irrigación cerebral insuficiente, y persistencia de signos clínicos durante 24 horas o más. Se caracteriza por hemiplejía de comienzo agudo, convulsiones focales o generalizadas, compromiso de la conciencia, estupor, coma, defectos del campo visual y movimientos involuntarios.

Como características más destacables, el ACV pediátrico es una patología de etiologías múltiples e instalación rápida, con menor mortalidad que la observada en adultos, pero con mayor morbilidad, y las secuelas más frecuentes son epilepsia, déficit motor y déficit mental. Las formas clínicas de presentación del ACV en niños y adolescentes dependerán del mecanismo isquémico o hemorrágico subyacente, y del tamaño del territorio cerebral comprometido. Es generalmente similar al de los pacientes adultos. Sin embargo, en neonatos, lactantes y niños pequeños, su presentación clínica suele ser más compleja. La ayuda brindada por los estudios de imágenes, resulta clave para la eventual identificación etiológica. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN), puede revelar el tenor de la disminución del flujo sanguíneo carotídeo, y localizar las ramificaciones vasculares en el caso de la enfermedad de Moya-Moya, o bien la presencia adicional de calcificaciones en los ganglios de la base observadas en la tomografía, puede sugerir la presencia de una encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica (MELAS). Existe una larga lista de enfermedades de la infancia que por diferentes mecanismos pueden precipitar o desarrollar un accidente cerebro-vascular (isquémico y/o hemorrágico). Las mismas, pueden ser agrupadas según el tipo de trastorno primario que produzcan, ya sean malformaciones vasculares (Tabla 4) o bien patologías prohemorrágicas (Tabla 5), o enfermedades sistémicas (Tabla 6) (17, 18).

Tabla 4. Enfermedades hereditarias asociadas a aneurismas intracraneales

<i>Síndrome de Ehlers-Danlos</i>	<i>Síndrome de Marfán</i>
<i>Moya-Moya</i>	<i>Pseudoxantoma elastásico</i>
<i>Riñón poliquistico</i>	<i>Glucogenosis tipo II</i>
<i>Displasia fibromuscular</i>	<i>Esclerosis Tuberosa</i>
<i>Deficiencia de α-antitripsina</i>	<i>Displasia Fibrovascular</i>
<i>Alcaptonira</i>	<i>Talangiectasia (hemorrágica) hereditaria</i>
<i>Enfermedad de Fabry</i>	<i>Neurofibromatosis tipo I</i>
<i>Síndrome de Noonan</i>	

Tabla 5. Desórdenes primarios de la coagulación asociados con hemorragias intracraneales

<i>Deficiencias de factores de la coagulación:</i> Factor V; Factor VII; Factor VIII (Hemofilia A); Factor IX (Hemofilia B); Factor X; Factor XII, Factor XIII; Deficiencia del cofactor de Heparina; Afibrinogenemia.
<i>Anemia de Fanconi</i>
<i>Trombocitopenia asociada a enfermedades metabólicas:</i> Hiperglicinemia; Acidemia metil-malónica; acideia isovalérica.
<i>Trombastemia de Glanzman</i>
<i>Trombocitopenias hereditarias</i>

Tabla 6. Enfermedades sistémicas que causan ACV en niños

<i>Hemoglobinopatías:</i>
Anemia falciforme por Hb-S (Sickle Cell anemia); Talasemias (su asociación con ACV es menos común que Hb-S).
<i>Coagulopatías protrombóticas:</i>
Síndrome antifosfolipídico: Anticoagulante Lúpico.
Anticuerpos anticardiolipinas, o asociados a colagenopatías autoinmunes.
Síndrome de Sennon; Síndromes clínicos como Sjorgen; Behcehet, artritis, enfermedades del tejido conectivo.
<i>Enfermedades Mitocondriales:</i>
Oftalmoplegía crónica progresiva expterna
Síndrome de MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke)
Epilepsia mioclónica con fibras "Ragged red"
Neuropatía óptica hereditaria de Leber
Síndrome de Kearn-Sayre
Enfermedad de Leigh
<i>Desórdenes en el metabolismo de la Homocisteína (Homocistinurias)*</i>
Deficiencias Severas de Vitamina B ₁₂ y Acido Fólico
Trastorno hereditarios metabólicos y de transporte de dichas vitaminas
Homocistinurias insensibles a vitamina B ₆
*El 33-50% de los casos sufren eventos trombóticos antes de los 25 años, y el 33% corresponde a episodios de ACV.
<i>Enfermedades del tejido conectivo:</i>
Ehlers-Danlos tipo 4
Síndrme de Marfan
Pseudoxantoma elásticum
Neurofibromatosis tipo 1

Entre las enfermedades sistémicas con compromiso del SNC que pueden asociarse a ACV, deben considerarse las infecciones oportunistas secundarias a trastornos inmunes tanto hereditarios como adquiridos (Ej. HIV). En esta última entidad, durante el desarrollo del Neuro-SIDA, la infección oportunista (cerebral) más común es por toxoplasmosis (igual que en adultos), pero se han descrito también otras infecciones con igual repercusión en SNC como citomegalovirus, herpes, sífilis, chagas o histoplasmosis (19) o bien masas ocupantes tumorales como linfoma cerebral primario (20). En un grupo de 9 pacientes HIV+ con edades entre 7 meses y 7 años, se desarrollaron ACV en 8 de tipo isquémicos y en 1 de tipo hemorrágico. Los mismos se produjeron en ausencia de las infecciones oportunistas mencionadas, y correlacionaron en todos los casos con una importante caída del recuento periférico de los linfocitos CD4, durante el curso del tratamiento antirretroviral. Este hecho pone de manifiesto la importancia del sistema inmunológico en el mantenimiento de la indemnidad del SNC (21).

ACV EN PACIENTES ADULTOS

La clasificación de la enfermedad cerebrovascular isquémica observada en pacientes adultos, toma en cuenta fundamentalmente los distintos trastornos obstructivos de la irrigación sanguínea cerebral, y los categoriza según la localización de las lesiones, el territorio vascular comprometido, el tiempo de duración de los síntomas, la edad del paciente, o bien la etiología del cuadro. Desde el punto de vista del territorio vascular comprometido (2), se subclasifican en:

A. ACV con compromiso de los grandes vasos

Frecuentemente asociada a aterosclerosis por depósitos en la bifurcación de la carótida primitiva, y en menor medida debido a displasia fibromuscular y disecciones.

- *Arterias Carótidas:* provoca trastornos motores y sensitivos en el hemi-cuerpo contralateral, asociado a afasia o apraxia si corresponde al hemisferio dominante. Ante la presencia de hemianopsia homónima, debe considerarse el posible compromiso del lóbulo temporal o bien de la arteria oftálmica que es una rama de la arteria carotídea, y provoca un defecto retiniano isquémico.

- *Arterias Vertebrales*: las manifestaciones clínicas más frecuentes, relacionadas al Síndrome de Wallenberg, se manifiestan por nistagmo, hipoestesia facial, parálisis de cuerdas vocales, y síndrome cerebeloso (Vértigo-nauseas-vómitos)
- *Arterias Basilares*: su obstrucción provoca un cuadro que se denomina “*enclaustramiento*”, donde el paciente está lúcido, siente, entiende, escucha, pero aparenta estar en coma, al no poder realizar movimientos voluntarios ni relacionarse con el medio, debido al compromiso de las vía corticoespinal (parálisis motora) y córtico-nuclear (anartria), por lo que sólo puede realizar movimientos oculares verticales.

B. ACV con compromiso de los vasos circunferenciales

- *Arteria cerebral anterior*: su obstrucción proximal suele provocar un cuadro de hemiplejía contralateral y signos prefrontales. En tanto que su obstrucción distal, suele producir un cuadro de plejía y alteraciones sensitivas de miembro inferior contralateral, con paresia de brazo pero indemnidad de la cara. A estas características se suelen sumar la apatía, abulia, afecciones esfinterianas.
- *Arteria cerebral media*: su obstrucción proximal produce habitualmente hemiparesia (faciobraquial) y afasia motora si afecta el hemisferio dominante. En la mayoría de estos pacientes, el ACV se produjo a consecuencia de infartos cardioembólicos y un 50% de ellos, se transforman en ACV-hemorrágicos.
- *Arteria cerebral posterior*: su obstrucción compromete las funciones corticales visuales, y produce cuadriantopsias y hemianopsias, que suelen asociarse con alucinaciones visuales en el área ciega del campo visual.

C. ACV con compromiso de los vasos penetrantes

Son ramas de 0,1 a 0,5 mm de diámetro, que afectan cerca del 25% de los casos y provocan los llamados infartos lacunares con localización en los ganglios basales, cápsula interna, sustancia blanca circundante a estas áreas y la profundidad del tronco cerebral. En la mayoría de los casos, estas arterias se afectan como consecuencia de trastornos hipertensivos (70%). Los síndromes más frecuentes de estas lesiones son: **a)** Síndrome Motor puro: produce hemiparesia que afecta cara-brazo y pierna en igual intensidad; **b)** Síndrome Sensitivo puro: afecta el hemicuerpo con perfecta diferenciación en la línea media; **c)** Síndrome Sensitivo-Motor (Mixto): se presentan ambos cuadros anteriores sin afección cortical; y **d)** Disartria con

disfagia o Disartria mano-torpe: al cuadro de disartria se le agrega la torpeza motora de miembro superior homolateral al trastorno craneal.

También se pueden producir infartos en territorios limítrofes de estas arterias, secundario a importantes caídas de la presión arterial (generalmente luego de un paro cardíaco que se resuelve a destiempo, y compromete el flujo sanguíneo en los vasos terminales. Por otra parte, existen los trastornos isquémicos que se modifican con el curso del tiempo, como los casos de episodios isquémicos reversibles que se los clasifica acorde a su duración como: *Ataque Isquémico Transitorio (TIA)*, *Defecto Neurológico Isquémico Reversible* y *Ataque Constituido*. A diferencia de estas tres entidades que evolucionan hacia una recuperación progresiva a distintos tiempos, existe una entidad denominada *Infarto Progresivo*, que se caracteriza por el empeoramiento paulatino entre el día 1 al 5 días de iniciado el cuadro clínico (8).

Diagnósticos diferenciales

Se debe considerar la posible presencia de diferentes cuadros clínicos, que acompañados con distintos estudios complementarios permitan arribar al diagnóstico clínico diferencial (Tabla 7).

Tabla 7. Posibles diagnósticos diferenciales

-
- *ACV Isquémico*
 - *ACV Hemorrágico*
 - *Trauma cráneo-cerebral y cervical*
 - *Meningitis y/o encefalitis*
 - *Masa Intracraneal (Tumor; Hematoma subdural)*
 - *Convulsiones*
 - *Migraña*
 - *Alteraciones Metabólicas*
 - *Hiper glucemia (coma hiperosmolar no cetónico)*
 - *Alteraciones metabólicas hereditarias (mitocondriales, lisosomales, etc.)*
 - *Hipoglucemia*
 - *Isquemia post insuficiencia y/o paro cardíaco*
 - *Sobredosis de drogas psicotrópicas*
 - *Trastornos trombóticos*
 - *Trastornos hemorrágicos*
 - *Maltrato (especialmente en niños pequeños y lactantes)*

FACTORES DE RIESGO PARA LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

Teniendo en cuenta la gran importancia que ha cobrado desde el punto de vista clínico y para la salud pública a escala mundial del ACV y su impacto económico-

social, resulta de gran valor determinar los posibles factores heredables (si los hubiere) que determinan una mayor predisposición al desarrollo de esta enfermedad. Si evaluamos la amplia gama de causas que desembocan en el proceso de “obstrucción y/o pérdida de flujo sanguíneo” del ACV, es lógico considerar que esta enfermedad no es una patología genética. Sin embargo, debemos asumir que muchas de las causas de ACV, tienen necesariamente factores genéticos predisponentes a precipitar el fenómeno oclusivo. En base a este razonamiento, deberíamos considerar que dichos factores genéticos, pueden ser a su vez, el escenario predisponente para que uno o más factores adquiridos, incidentales o presentes crónicamente, precipiten el ataque cerebral, el cual no se produciría con la misma facilidad en individuos, sin la carga genética mencionada (23, 24).

Hoy día, sabemos que sí existen estos factores heredables que son de alto riesgo de desarrollo de ACV, como sucede en las aneurismas hemorrágicas subaracnoideas, hemangiomas cavernosos, el síndrome de CADASIL (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*) (25), varios casos de síndrome antifosfolipídico, hiperhomocistinemias, etc. Es de destacar que el amplio espectro de la diversidad clínica del ACV hace difícil establecer un patrón fenotípico único, por lo cual el estudio genético molecular debe ser planteado en forma dirigida y asociada al potencial factor desencadenante. De hecho, el importante avance en la caracterización de esta enfermedad que se logra con los estudios de imágenes de alta resolución como Angiografías por RNM, SPECT, PET, etc, permiten asegurar un diagnóstico de certeza y determinar mejor su mecanismo y etiología (9). En este sentido, si el trastorno fuera una patología trombótica, deberán considerarse aquellos trastornos genéticos que en forma directa o indirecta, favorecen y/o precipitan el fenómeno oclusivo. Si el ACV fuera secundario a un pico hipertensivo, deberíamos postular como genes candidatos a aquellos relacionados a la regulación de los mecanismos de dicho trastorno.

Genes candidatos que predisponen al accidente cerebrovascular

La posible influencia genética en el desarrollo del ACV, resulta importante a la hora de predecir, explicar o al menos contribuir a identificar el factor etiológico de esta enfermedad, especialmente cuando los factores de riesgo considerados clínicamente evidentes, como el tabaquismo, la hipertensión, diabetes, etc., no están presentes o

no son clínicamente tan evidentes. Sin embargo, también resulta importante para considerar los ¿por qué?, del amplio espectro de la variabilidad clínica observada entre los pacientes pertenecientes a los grupos de riesgo más comunes. Otro aspecto intrigante, es establecer si aquellos genes que fueron descritos estar relacionados a patologías cardiovasculares, resultaran ser también factores comunes a trastornos en todos los vasos, o si por el contrario, debíamos sospechar la existencia de alteraciones genéticas con repercusión órgano-específicas.

Sin duda, el propio nombre de ACV, refiere a una patología vascular de localización cerebral, pero en realidad corresponde por la clínica y la patología cerebral, a un trastorno por falta de aporte de oxígeno. En consecuencia, si buscásemos genes de riesgo deberíamos investigar en aquellos que se vinculen con el causal mecánico que desencadena la falta de oxígeno, y que en definitiva resulta ser siempre un trastorno oclusivo, más allá si su patología de base es un síndrome de hipercoagulabilidad, o bien, una patología de obstrucción progresiva como la aterosclerosis que desembocará en un cuadro trombótico. Por tal motivo, todos los intentos de identificar genes candidatos de riesgo para el ACV, fueron dirigidos en aquellos relacionados a los mecanismos de hipercoagulabilidad, hipertensión, hiperlipemia, malformaciones vasculares (26, 27).

El meta análisis de 187 estudios de ACV, que comprendieron más de 37.000 casos, y de 95.000 controles, donde se investigaron 43 polimorfismos de 29 genes candidatos de asociación con el desarrollo del ACV, mostró una relación positiva entre ACV y los polimorfismos de los genes Factor V Leiden (Gln506), ACE I/D, MTHFR (C677T), Protrombina (G20210A), PAI-1 (5G-alelo) y glicoproteína IIIa (Leu33Pro). Este estudio, mostró una relación independiente entre estos genes con el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria, pero a su vez, también mostró, en cuatro de ellos (Factor V Leiden, ACE, MTHFR y Protrombina 20210), una relación causal entre los polimorfismos estudiados y el desarrollo de ACV (28). En otro estudio sobre 9 variantes de 6 genes (ACE, Protrombina 20210, Factor V de Leiden, Integrina- α 2, MTHFR y NOS3) se pudo determinar que si bien todos tenían una correlación positiva, la más alta asociación causal con ACV estaba con los genes ACE, MTHFR, y NOS3 (29).

Más recientemente se han descrito mutaciones del gen de la Hemocromatosis que predice un mayor riesgo de ACV isquémico (30-32). En un trabajo multicéntrico, se estableció que una nueva mutación correspondiente a la proteína de adhesión (Ninjurina-2), resultó altamente prevalente en pacientes con ACV agudo (33).

EL DESAFÍO TERAPÉUTICO

Las actuales terapias del ACV agudo, lamentablemente se encuentran dirigidas solamente a intentar recuperar el flujo sanguíneo interrumpido, tan pronto como sea posible. Los estudios experimentales basados en estrategias de neuroprotección, ya sea por impedimento, interrupción o enlentecimiento de los procesos de daño celular mencionados, han sido testeados con diferentes agentes, sin embargo, a la fecha, la única terapia aceptada internacionalmente, y aprobada por la FDA (USA), está basada en el uso de tPA recombinante humano (tPA-rh), y dirigida exclusivamente a restaurar la “normalidad” sobre la primera fase del problema, es decir el fenómeno obstructivo (34-36) (Figura 6).

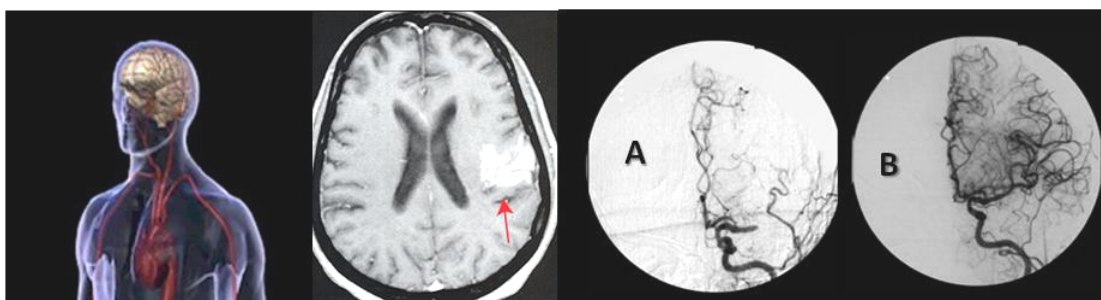


Figura 6. Lesión isquémica demostrada en la RNM (→). (A) pérdida de flujo sanguíneo de la arteria cerebral media, secundaria a una obstrucción por coagulación arterial; y (B) su recuperación por tratamiento fibrinolítico dentro de las primeras horas de iniciado el cuadro agudo de ACV monitoreado por angiorensonancia

Es una obviedad que este es el primer objetivo a resolver, dado que sin duda de nada servirá ninguna otra estrategia terapéutica, si no se restaura la debida oxigenación del tejido isquémico (reperusión). Sin embargo el tratamiento con tPA-rh se encuentra exclusivamente limitado a aquellos pacientes quienes sufrieron el episodio isquémico tan sólo tres horas antes de iniciar esta terapia. ¿Acaso significa que el tPA-rh es inefectivo para la recuperación del flujo vascular, luego de transcurridas las tres horas mencionadas? O en realidad, ¿se desencadenó una larga lista de eventos

biológicos que convierten en “irrelevante” toda potencial eficacia del tPA-rh? Es decir que transcurrido dicho tiempo, los cambios intracerebrales (no vasculares) pueden reducir a la nulidad la ventana terapéutica del ACV. Esto significa que la falta de oportunidades de exitoso, cualquiera fuera el tratamiento, podría estar más relacionada a las consecuencias biológicas desencadenadas sobre el cerebro y particularmente sobre las neuronas expuestas a la privación de O₂ por más tiempo de tres horas mencionadas. La restringida habilidad de las drogas de ingresar al sistema nervioso central, responde a la acción limitante ejercida por la barrera hematoencefálica (BHE), pero dicha limitación, sin embargo en condiciones normales no resulta ser completa. La llamada “ventana terapéutica” del ACV, de muy corta duración, dejará de ser una ventana permisiva luego de la isquemia, a pesar de tratarse de las mismas drogas que son administradas al mismo paciente, y donde la única variable es el tiempo transcurrido hasta iniciar dicha administración. ¿Cuales son entonces los mecanismos que puedan explicar estos cambios que “cerraron” aparentemente en forma definitiva la “ventana terapéutica”, impidiendo cualquier tratamiento de neuroprotección posterior? Adicionalmente, al rol ejercido por la BHE, las células del parénquima cerebral y particularmente las neuronas, pueden desarrollar, incentivar y sobre-expresar diferentes genes vinculados al rescate antiapoptótico, escenario en el cuál se incrementa la expresión de una larga lista de proteínas (enzimas, receptores, transportadores, factores de crecimiento, etc.), todas relacionadas al intento de restitución energética balanceando la activación proapoptótica secundaria. Dentro de esta explosión fenotípica, se produce también la inducción de diversos mecanismos (selectivos y/o no-selectivos) que obstaculizarán el ingreso de las drogas al SNC y particularmente a las neuronas hipóxicas.

Recientemente, se ha podido demostrar que el gen de resistencia múltiple a drogas (MDR-1), que codifica una glucoproteína (P-gp) de membrana de 170 kD, también será inducida por el HIF-1 α (37). P-gp es una bomba de expulsión de compuestos potencialmente tóxicos para la célula, y su expresión, genera refractariedad a una amplia gama de drogas, de estructura química muy diferentes y funcionalmente no relacionadas entre sí. La P-gp, está normalmente expresada por los tejidos y órganos excretores, y también en la BHE (38). Su presencia en la BHE es el motivo por el cual una larga lista de compuestos que no tienen acceso al SNC, sin embargo, dicha

expresión normal de P-gp en BHE, no impide la llegada y el efecto terapéutico de las drogas que habitualmente se utilizan para distintos trastornos del SNC. Experimentalmente, hemos podido demostrar con diferentes modelos que la hipoxia cerebral induce un alto nivel de expresión de P-gp en diferentes áreas y tipos celulares cerebrales, particularmente en las neuronas hipóxicas. Este hecho sugiere que la sobre-expresión de la P-gp en dichas neuronas sería un impedimento para la acción neuroprotectora con fármacos convencionales ³⁹⁻⁴².

Desde el punto de vista de la neurorreparación, muy reciente, se puso en evidencia la plasticidad de las células progenitoras de la MO, dado que fueron capaces de repoblar la vasculatura cerebral neoformada, luego de la obstrucción experimental de la arteria cerebral media. Las células de la MO de un ratón macho fueron primero transfectadas con la proteína GFP fluorescente (verde), y luego infundidas a un ratón hembra normal. Este segundo ratón, es sometido luego a la oclusión de la arteria cerebral media. Después del tratamiento combinado con factores de crecimiento (G-CSF y SCF) se observó una franca mejoría de la lesión isquémica, y sorprendentemente, la presencia de las células quiméricas XY-FGP positivas, en los vasos neoformados en la región cerebral lesionada de ratón hembra receptor de las células progenitoras transfectadas (43) (Figura 7). Si bien este experimento dista de ofrecer una solución “rápida” y aplicable dentro de la ventana terapéutica del ACV, permite proponer terapias de “reparación” por el estímulo de células progenitoras, como complemento de las terapias de neuroprotección del tejido isquémico.

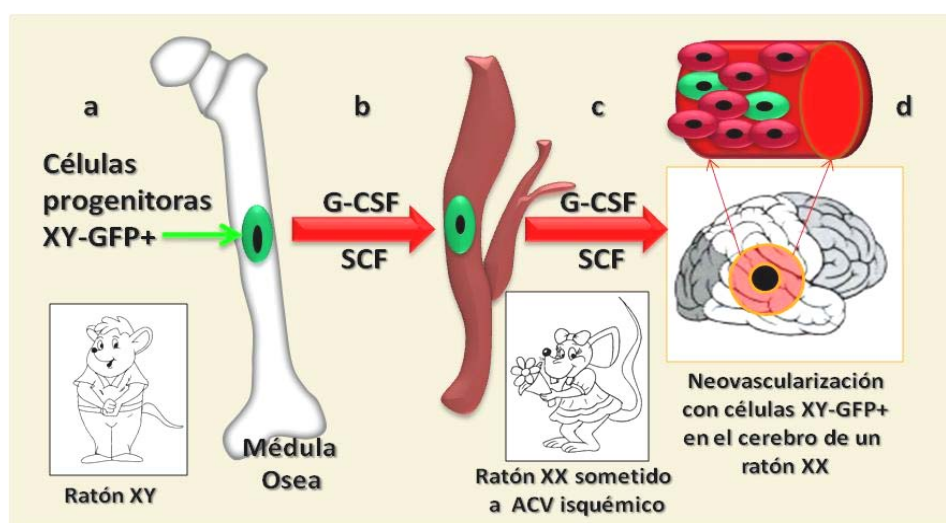


Figura 7. Uso de células progenitoras de MO en la neurorreparación del ACV. **a**-transfección. **b**-cosecha e infusión, **c**-estimulación y **d**-detección en el SNC.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Sin duda, hasta la actualidad, la mejor terapéutica del ACV es el tratamiento preventivo, para disminuir el peso de los factores de riesgo, y/o para accionar sobre los factores etiológicos primarios arriba descritos. El problema es que una vez producido el ACV, las herramientas actuales de tratamiento están dirigidas al episodio agudo (durante el cuadro crítico) y con muy escasa oportunidad de aplicación, o bien a la prevención del desarrollo de recurrencias del ACV y de sus secuelas, o finalmente al tratamiento sintomático y de rehabilitación de las secuelas propiamente dichas.

Estas terapias no son sólo farmacológicas, sino que debe acompañarse de conductas sociales y hábitos alimentarios acordes. Este enorme esfuerzo sólo es posible en un ámbito multidisciplinario tanto en el área de la salud como educativo y científico, y que abarcan desde la atención primaria del paciente hasta las investigaciones básicas y aplicadas. Sin embargo, se requieren además el desarrollo de políticas coordinadas local y globalmente, a fin de incrementar los esfuerzos en la prevención y evitar los trastornos derivadas de los factores sociales. Valga como ejemplo mencionar, que una de las causas más prevalentes de esta patología son los accidentes obstétricos, y la gran mayoría de ellos responden a graves falencias de infraestructura, cuidados durante la gestación y las más elementales medidas de higiene, alimentación y atención primaria del embarazo y parto.

Si somos capaces de enfrentar el problema desde su prevención, y agregar desde el punto de vista terapéutico neuroprotector y neuroreparador con las herramientas más modernas brindadas tanto desde el manipuleo genético junto con el uso “programado” de células progenitoras, estaremos a las puertas de la resolución de una de las patologías más discapacitantes de la historia.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Deaths from stroke and global burden of stroke. In: Mackay J, Mensah GA, eds. *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. Geneva: World Health Organization, 2004: 48-51.
2. Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* 2003; 2: 43-53.
3. Lavados P, Hennis A, Fernandes J, Medina MT, Legetic B, Hoppe H, Sacks C, Jadue L, Salinas R. Stroke epidemiology, prevention, and management strategies at a regional level: Latin America and the Caribbean. *Lancet Neurol* 2007;6:362-72
4. Caplan L. Posterior Circulation Ischemia: Then, Now, and Tomorrow. *Stroke*. 2000;31:2011-2023.

5. Pierson D. Pathophysiology and Clinical Effects of Chronic Hypoxia. *Respir Care* 2000;45:39-511.
6. Ratan RR, Siddiq A, Smirnova N, Karpisheva K, Haskew-Layton R, McConoughey S, Langley B, Estevez A, Huerta PT, Volpe B, Roy S, Sen ChK, Gazaryan I, Cho S, Fink M, LaManna J. Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke. *J Mol Med* (2007) 85:1331-1338.
7. Lekera R, Shohamib E. Cerebral ischemia and trauma—different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Research Reviews* 2002;39:55-73.
8. Van der Worp H and van Gijn J Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 2007;357:572-9.
9. Little W. On the influence of abnormal parturation, difficult labours, premature birth, and asphyxia neonatorum on the mental and physical condition of the child, especially in relation to deformities. *Trans Obstet. Soc London* 1861; 3: 293.
10. Legido A, Katsetos CD. Parálisis cerebral: nuevos conceptos etiopatogénicos. *Rev Neurol* 2003;36:157-165.
11. Dlamini N, Kirkham FJ. Stroke and cerebrovascular disorders. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21:751-61.
12. Baldwin K, Orr S, Briand M, Piazza C, Veydt A, McCoy S. Acute ischemic stroke update. *Pharmacotherapy.* 2010;30:493-514.
13. Tang XN, Liu L, Yenari MA Combination therapy with hypothermia for treatment of cerebral ischemia. *J Neurotrauma.* 2009;26:325-31.
14. Gustavson ML, Hagberg HB, Sanner G. Identical syndromes of cerebral palsy in the same family. *Acta Paediatr Scand* 1969; 58: 330-40.
15. Martínez F, Tomás M, Millán JM, Fernández A, Palau F, Prieto F. Genetic localisation of mental retardation with spastic diplegia to the pericentromeric region of the X chromosome: X inactivation in female carriers. *J Med Genet* 1998; 35: 284-7.
16. Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Appleyard M, Sillesen H, Boysen G, Nordestgaard BG. Hereditary hemochromatosis genotypes and risk of ischemic stroke. *Neurology.* 2007;68:1025-31.
17. Del Balzo F, Spalice A, Ruggieri M, Greco F, Properzi E, Iannetti P. Stroke in children: inherited and acquired factors and age-related variations in the presentation of 48 paediatric patients. *Acta Paediatr.* 2009;98:1130-6.
18. Karkare S, Merchant S, Solomon G, Engel M, Kosofsky B. MELAS with A3243G mutation presenting with occipital status epilepticus. *J Child Neurol.* 2009;24:1564-7.
19. Connor M. Infect Disord Drug Targets. 2010;10:76-83. Human immunodeficiency virus (HIV) and stroke: targets for intervention.
20. Scrigni A, Nastro M, Rodríguez de Schiavi S, Czornyj L, Felice M, Mantese B. Leptomenigeal lymphoma in a child with acquired immune deficiency syndrome. *Neuropediatrics.* 2006;37:121-5.
21. Czornyj LA. Encephalopathy in children infected by vertically transmitted human immunodeficiency virus. *Rev Neurol.* 2006;42:743-53.
22. Muir KW, Buchan A, von Kummer R, Rother J, Baron JC. Imaging of acute stroke. *Lancet Neurol* 2006;5:755-68.
23. Johnston SC. Transient ischemic attack. *N Engl J Med* 2002;347:1687-92.
24. Schulz UGR, Rothwell PM. Differences in vascular risk factors between etiological subtypes of ischemic stroke: Important of population-based studies. *Stroke* 2003; 34:2050-2059.
25. Charles A. Cadasil Pathogenesis, clinical and radiological findings and treatment. *Arq Neuropsiquiatr.* 2010;68(2):287-99.
26. Jood K, Ladenvall P, Tjärnlund-Wolf A, Ladenvall C, Andersson M, Nilsson S, Blomstrand C, Jern C. Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke. *Stroke* 2005;36:2077-2081.
27. Rao R, Tah V, Casas JP, Hingorani A, Whittaker. Ischaemic stroke subtypes and their genetic basis: a comprehensive meta-analysis of small and large vessel stroke. *Eur Neurol* 2009;61: 76-86.
28. Paul Bentley, George Peck, Liam Smeeth, John Whittaker, Pankaj Sharma. Causal Relationship of Susceptibility Genes to Ischemic Stroke: Comparison to Ischemic Heart Disease and Biochemical Determinants. *PLoS ONE.* 2010;5,2: e9136
29. Fan A, Fang J, Yesupriya A, Chang M, Kilmer G, House M, Hayes D, Renée M Ned, Dowling N, Mokdad A. Gene polymorphisms in association with self-reported stroke in US adults. *The Application of Clinical Genetics* 2010;3 23-28.
30. Njajou OT, Hollander M, Koudstaal PJ, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM, van Duijn CM. Mutations in the hemochromatosis gene (HFE) and stroke. *Stroke.* 2002;33(10):2363-6.
31. Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Appleyard M, Sillesen H, Boysen G, Nordestgaard G. Hereditary hemochromatosis genotypes and risk of ischemic stroke. *Neurology* 2007;68:1025-1031.

32. Hruskovicová H, Milanez T, Kobal J, Potisk KP, Petrovic D, Peterlin B. Hemochromatosis-causing mutations C282Y and H63D are not risk factors for atherothrombotic cerebral infarction. *Med Sci Monit.* 2005;11(7):BR248-52.
33. Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, Fornage M, DeStefano AL, Aulchenko YS, Debette S, Lumley T, Folsom AR, van den Herik EG, Bos MJ, Beiser A, Cushman M, Launer LJ, Shahar E, Struchalin M, Du Y, Glazer NL, Rosamond WD, Rivadeneira F, Kelly-Hayes M, Lopez OL, Coresh J, Hofman A, DeCarli C, Heckbert SR, Koudstaal PJ, Yang Q, Smith NL, Kase CS, Rice K, Haritunians T, Roks G, de Kort PL, Taylor KD, de Lau LM, Oostra BA, Uitterlinden AG, Rotter JI, Boerwinkle E, Psaty BM, Mosley TH, van Duijn CM, Breteler MM, Longstreth WT Jr, Wolf PA. Genome wide association studies of stroke. *N Engl J Med* 2009;360: 1718–1728.
34. Greenberg SM. Research on Stroke Small Vessels, Big Problems. *NEJM* 2006; 354;14:1451-3.
35. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995;333:1581-7.
36. The NINDS t-PA Stroke Study Group. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. *Stroke* 1997;28:2109-18.
37. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 2002;62:3387–3394.
38. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;38:1277-1287.
39. Ramos AJ, Lazarowski A, Villar MJ, Brusco A. Transient Expression of MDR-1/P-Glycoprotein in a Model of Partial Cortical Devascularization *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:101-107.
40. Lazarowski A, Caltana L, Merelli A, Rubio MD, Ramos AJ, Brusco A. Neuronal mdr-1 gene expression after experimental focal hypoxia: a new obstacle for neuroprotection? *J Neurol Sci.* 2007;258(1-2):84-92.
41. Aviles-Reyes RX, Angelo MF, Villarreal A, Rios H, Lazarowski A, Ramos AJ. Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *J Neurochem.* 2010;112:854-69.
42. Merelli A, Caltana L, Girimonti P, Ramos AJ, Lazarowski A, Brusco A. Effects of Intranasal delivery of Human Recombinant Erythropoietin (rHuEpo) on spontaneous motor activity in hypoxic rats. (2010; In press)
43. Key S, Parmelee A, Mayer B, Nemeth K, Bratincsak A, Mezey E. The combination of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow-derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia. *Blood* 2008; 111:5544-5552.

BASES FISIOPATOLÓGICAS DE LA EPILEPSIA

Feria-Velasco AI, Barajas-Mercado S, Feria-Cuevas Y.

Laboratorio de Neurobiología Celular, Instituto de Neurobiología, Depto. de Biol. Cel. y Mol., CUCBA, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

CONSIDERACIONES GENERALES

La epilepsia es una alteración crónica del sistema nervioso central que se caracteriza por una excitabilidad excesiva, con sincronización y reclutamiento de impulsos nerviosos, que se manifiesta con crisis recurrentes, espontáneas, autolimitadas e impredecibles, que pueden ser convulsivas o no convulsivas. Así, las manifestaciones clínicas son muy variadas; cuando se manifiesta la epilepsia con crisis convulsivas, éstas pueden ser generalizadas o parciales, si involucran los músculos de todo el organismo o un grupo de músculos, respectivamente. Puede haber pérdida de la conciencia o no, en cuyo caso se habla de crisis convulsivas complejas o simples, respectivamente. De acuerdo con el tipo de movimientos que se presentan, las crisis pueden ser tónicas, clónicas, clónico-tónicas o mioclónicas (1, 4, 9).

Las causas son muy diversas y sólo en cerca del 40% de los casos de epilepsia se pueden identificar los factores causales del padecimiento. Sin embargo, con los estudios modernos de imagenología y otros procedimientos diagnósticos no invasivos, es posible que esas cifras aumenten en el futuro cercano y de esta forma, se puedan diseñar esquemas más adecuados de tratamiento, con mejores resultados. Esta alteración es reconocida por la Organización Mundial de la Salud, como un problema de salud pública y sus indicadores fundamentales son su incidencia y su prevalencia, sin hacer de lado los aspectos de frecuencia, de morbilidad y de mortalidad.

La incidencia de la epilepsia representa el número de nuevos casos de epilepsia diagnosticados entre la población de riesgo, en un área determinada y en un tiempo

definido. Los datos obtenidos ayudan a conocer posibles factores causales en esa población afectada (5).

La prevalencia de la epilepsia representa el número total de casos que en un momento determinado se contabilizan en un área definida. La información así obtenida será de utilidad para determinar las necesidades de atención médica de los pacientes, así como para la planeación y diseño de programas de salud y otras medidas, como las de carácter educativo en apoyo a los pacientes y sus familiares. En un estudio multinacional realizado en Colombia, Ecuador, México, Panamá y Venezuela y con el empleo de un protocolo de la Organización Mundial para la Salud, se encontró una tasa de prevalencia de 14 a 57 casos por cada mil personas. Al tomar en consideración diferentes factores de riesgo como daño perinatal, cisticercosis cerebral, traumatismo craneoencefálico, etc. En México, se han encontrado cifras de 10 a 20 casos por mil personas (2, 5).

Conforme avanza la edad, tanto la incidencia, como la prevalencia de epilepsia se incrementan, mientras que parece no haber diferencias significativas al comparar estos indicadores entre hombres y mujeres (5).

En general, la mortalidad en casos de epilepsia tiene una tasa baja. Así, se ha identificado una tasa de 1 a 4.5 por cada cien mil casos de epilepsia y es muy importante analizar cuidadosamente los factores relacionados con esos eventos fatales, ya que pueden ser de naturaleza muy variada, consecutivas a condiciones concomitantes o resultantes de las crisis convulsivas, como caídas, asfixia, etc., más que a condiciones directamente relacionadas con el fenómeno convulsivo en el sistema nervioso central (1, 4, 5).

Con base en lo anteriormente mencionado, es de esperarse que los mecanismos que subyacen a los fenómenos convulsivos y en general a los estados de hiperexcitabilidad cerebral que se traducen en epilepsia convulsiva o no convulsiva, son extremadamente variados.

FACTORES CAUSALES

Las causas de los cuadros epilépticos varían de acuerdo con la edad de los pacientes y debe tenerse en consideración, que no todas las crisis convulsivas corresponden a epilepsia, ya que hay condiciones o partes de una enfermedad que durante su curso

y como parte de su sintomatología, se presentan las convulsiones. Estas ya no se presentan más, una vez que se ha resuelto el problema subyacente o que se ha controlado la enfermedad o eliminado el factor directamente causante de la crisis. En este gran grupo de condiciones se encuentran las crisis febriles de la infancia, las provocadas por la privación de sustancias como alcohol, benzodiazepinas y otras drogas, o trastornos metabólicos cursan con hipocalcemia, hipoglucemia, entre otros (4, 7, 9, 13).

Entre los factores causales conocidos, en casos de epilepsia humana, están los siguientes:

- Alteraciones en el desarrollo prenatal
- Alteraciones en el período perinatal
- Alteraciones vasculares del sistema nervioso central
- Traumatismos cráneo-encefálicos
- Procesos inflamatorios e infecciosos del sistema nervioso central
- Infestaciones parasitarias en el sistema nervioso central
- Alteraciones cicatriciales y regenerativas
- Procesos neurodegenerativos
- Tumores del sistema nervioso central
- Otras causas

CLASIFICACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS

No obstante que las crisis epilépticas se han clasificado de diversas formas, de acuerdo con lo sugerido por los diferentes grupos de trabajo en el último siglo y medio, aquí se va a mencionar la denominada Clasificación Internacional de las Crisis Epilépticas que emitió el Grupo de Terminología y Clasificación, de la Liga Internacional Contra la Epilepsia, que se basa fundamentalmente en la presentación clínica de las crisis y las manifestaciones electroencefalográficas de las mismas y contempla los siguientes grupos (4, 9, 11, 12):

1. CRISIS FOCALES

- 1.1 CRISIS FOCALES SIMPLES
 - 1.1.1 De semiología motora
 - 1.1.1.1 Sin marcha
 - 1.1.1.2 Con marcha
 - 1.1.1.3 Versivas
 - 1.1.1.4 Posturales
 - 1.1.1.5 Fonatorias

- 1.1.2 De semiología sensitiva
 - 1.1.2.1 Somatosensorial
 - 1.1.2.2 Visuales
 - 1.1.2.3 Auditiva
 - 1.1.2.4 Gustativa
 - 1.1.2.5 Olfatoria
 - 1.1.2.6 Vertiginosa
- 1.1.3 De semiología autonómica
- 1.1.4 De semiología psíquica
 - 1.1.4.1 Disfásicas
 - 1.1.4.2 Dismnésicas
 - 1.1.4.3 Cognitivas
 - 1.1.4.4 Del talante
 - 1.1.4.5 Ilusiones
 - 1.1.4.6 Alucinaciones
- 1.2 **CRISIS FOCALES COMPLEJAS**
 - 1.2.1 Crisis focales simples, seguidas de desconexión
 - 1.2.2 Crisis con desconexión al inicio
 - 1.2.3 Con automatismos
- 1.3 **CRISIS FOCALES SECUNDARIAMENTE GENERALIZADAS**
 - 1.3.1 Crisis focales simples secundariamente generalizadas
 - 1.3.2 Crisis focales complejas secundariamente generalizadas
 - 1.3.3 Crisis focales simples que pasan a crisis focales complejas, secundariamente generalizadas
- 2. CRISIS GENERALIZADAS**
 - 2.1 AUSENCIAS
 - 2.2 MIOCLONÍAS
 - 2.3 TÓNICAS
 - 2.4 CLÓNICAS
 - 2.5 TÓNICO-CLÓNICAS
 - 2.6 ATÓNICAS
- 3. CRISIS NO CLASIFICADAS**
 - 3.1 NEONATALES SUTILES
 - 3.2 CRISIS DURANTE EL SUEÑO
 - 3.3 SIN CARACTERIZACIÓN PRECISA
- 4. OTRAS**
 - 4.1 CRISIS FORTUITAS
 - 4.2 CRISIS CÍCLICAS
 - 4.3 CRISIS PROVOCADAS POR ESTÍMULOS NO SENSORIALES
 - 4.4 CRISIS REFLEJAS
 - 4.5 ESTADO EPILÉPTICO

ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

Con el objeto de entender los mecanismos de producción de las convulsiones y en general, las manifestaciones de hiperexcitabilidad cerebral en los casos de epilepsia humana, los investigadores de diferentes grupos de trabajo han empleado diversos modelos experimentales en animales de laboratorio y en preparaciones de rebanadas de tejido cerebral. Esto, con la observancia de los lineamientos éticos internacionales para el uso y manejo de los animales de laboratorio.

El estudio controlado y sistematizado de los modelos experimentales se ha realizado fundamentalmente para: 1) investigar los mecanismos neuronales básicos implicados en la generación, propagación y supresión de las crisis epilépticas, sean o no convulsivas; 2) evaluar los mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos comúnmente conocidos; y 3) el diseño de nuevos fármacos anticonvulsionantes que pudieran tener mejores efectos antiepilépticos, menos efectos colaterales y de menor costo, que permitieran establecer esquemas más racionales y efectivos de tratamiento en la epilepsia humana.

A continuación, se mencionan los principales grupos de modelos experimentales, que han dado valiosa información y que han contribuido al mejor entendimiento de la fisiopatología de la epilepsia.

Los principales criterios empleados para clasificar los modelos experimentales de epilepsia son:

- El tiempo que transcurre entre el inicio del proceso aplicado en el modelo y el inicio y duración de las manifestaciones de hiperexcitabilidad cerebral. Así, los modelos experimentales pueden ser agudos o crónicos.
- De acuerdo con el tipo principal de crisis epileptiformes. Así, hay modelos agudos y crónicos de crisis parciales simples, complejas, de convulsiones tónico-clónicas generalizadas, de crisis de ausencia, *status epilepticus* y cuadros convulsivos genéticamente determinados en cepas de animales de experimentación.

MODELOS AGUDOS DE CRISIS PARCIALES SIMPLES

Las alteraciones cerebrales que se asocian a convulsiones en este tipo de modelos, se realizan en un solo evento condicionante, con un período corto de latencia y se pueden identificar cambios característicos electroencefalográficos, como ocurre en el humano en casos de traumatismos cráneo-encefálicos, abscesos cerebrales y hematomas cerebrales (3, 4).

Aplicación tópica de compuestos convulsionantes

La aplicación tópica de penicilina en la corteza cerebral motora de gatos y ratas ha sido el modelo más comúnmente empleado y ha sido muy útil en el análisis de la propagación de la actividad convulsiva y en el estudio de la biología de los elementos

neurales circunvecinos al foco epiléptico. Otras sustancias empleadas para producir focos epileptógenos agudos son la bicuculina, picrotoxina, estricnina y sustancias colinérgicas.

Estimulación eléctrica aguda

La aplicación de estímulos eléctricos repetitivos sobre el tejido cerebral puede producir descargas rítmicas que persisten segundos o minutos, después de haber cesado la estimulación. En estas condiciones, las descargas sólo se originan en el sitio de la estimulación eléctrica.

Abstinencia al GABA

La inyección de ácido gamma amino butírico (GABA) en corteza cerebral motora de monos, durante siete días, se ha empleado como un modelo subagudo de convulsiones focales. Después de este tiempo, aparecen espigas y trazos de espiga-onda en el electrocórtingrama y se acompañan de automatismos y mioclonos de las extremidades inferiores.

Estudios en rebanadas de tejido cerebral.

Este tipo de estudios se han realizado en rebanadas de neocorteza de rata, ratón, conejo y cobayo, mantenidas en medios de cultivo y expuestas a diversas sustancias convulsionantes y con la obtención de registros electrofisiológicos. Algo semejante se ha hecho en rebanadas de hipocampo.

MODELOS CRÓNICOS DE CRISIS PARCIALES SIMPLES

Metales implantados en corteza cerebral

Diversos metales implantados en corteza cerebral motora de gatos, ratas y monos se han empleado para producir crisis motoras focales secundariamente generalizadas. Entre éstos se encuentran el tungsteno, hierro, cobre, cobalto, zinc y aluminio. El modelo más comúnmente empleado ha sido la aplicación de gel de hidróxido de aluminio en sustancia blanca subyacente a la corteza motora de gatos y monos, ya que se producen convulsiones parciales simples espontáneamente recurrentes.

Otros modelos

Diversos autores han aplicado nitrógeno líquido o cloruro de etilo en corteza motora para producir focos epileptógenos que persisten por varios días. La inyección de

anticuerpos antigangliósidos cerebrales en la corteza motora de ratas ha producido la aparición de espigas anormales focales en un lapso de 24 horas, con crisis convulsivas generalizadas recurrentes hasta por períodos de 90 días.

MODELOS DE CRISIS PARCIALES COMPLEJAS

Este tipo de crisis convulsivas se originan principalmente en hipocampo y otras áreas del sistema límbico, aunque pueden originarse también en otras zonas de corteza cerebral (3,4).

Administración de ácido kaínico

La administración sistémica o inyección de ácido kaínico en hipocampo produce en gatos y ratas, una conducta motora estereotipada, actividad motora compleja y convulsiones tónico-clónicas generalizadas, que pueden ser de larga duración.

Estimulación eléctrica repetitiva de baja intensidad (*kindling*)

Este tipo de estimulación, en hipocampo y en amígdala produce cambios eléctricos cerebrales de hiperexcitabilidad y convulsiones. Por las características de los trazos eléctricos y de la secuencia de eventos en la conducta motora de los animales, este modelo ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los elementos neurales que participan en la producción y propagación del fenómeno convulsivo. Asimismo, se han obtenido resultados semejantes al *kindling*, mediante la inyección repetida de baja concentración de sustancias químicas en corteza cerebral e hipocampo, que inducen hiperexcitabilidad cerebral, como el pentilentetrazol.

Preparaciones de tejido cerebral y células aisladas

Diversos autores han estudiado los efectos eléctricos que se producen en rebanadas de tejido cerebral, principalmente de hipocampo, o de células nerviosas aisladas y mantenidas en medios de cultivo, por la aplicación de sustancias conocidas como convulsionantes.

MODELOS DE CONVULSIONES GENERALIZADAS

Estimulación eléctrica supramáxima

En este tipo de modelos, la estimulación eléctrica supramáxima se ha empleado ampliamente en diferentes animales de laboratorio, lo que ha permitido, no

solamente entender mejor los mecanismos que subyacen a las crisis generalizadas, sino que también se han empleado para el estudio de los mecanismos de acción de diversas sustancias anticonvulsiantes. La estimulación eléctrica se ha realizado en la oreja, en una extremidad o en la córnea de los animales de laboratorio empleados, que fundamentalmente han sido roedores.

Administración sistémica de sustancias convulsiantes

El compuesto que más se ha empleado para producir crisis generalizadas cuando se administra por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea, es el pentilentetrazol o metrazol. Sin embargo cada vez se utilizan otras sustancias administradas sistémicamente, como la 4-aminopiridina,

Convulsiones determinadas genéticamente

En este tipo de modelos, no se requiere de la aplicación sistémica o en el sistema nervioso central de sustancias químicas o medios físicos para la producción de hiperexcitabilidad cerebral y convulsiones. En estos modelos, la susceptibilidad a presentar convulsiones está determinada genéticamente y en general, estas son precipitadas por un incremento en la variedad, intensidad o frecuencia de los estímulos presentes en el entorno de los animales de experimentación.

Algunos de estos modelos semejan algunas formas de epilepsia humana, principalmente las de tipo reflejo, ante estímulos sensoriales, como situaciones estresantes, estímulos visuales repetitivos o estimulación auditiva, como desencadenantes de los episodios convulsivos. Las cepas de animales genéticamente pronos a presentar este tipo de convulsiones reflejas son muy variadas como ratas, ratones, gerbos, perros, gatos, monos, pollos, conejos, crisetos y hasta moscas de la fruta.

Modelos de crisis de ausencia

En el ser humano, las crisis de ausencia se caracterizan por una desconexión súbita del individuo, de su entorno, con estrecha correlación con la existencia de trazos espiga-onda, de 3 a 4 por segundo, en el electroencefalograma. No obstante que no se cuenta aún con modelos que correspondan totalmente a estas condiciones, algunos autores han logrado aproximaciones importantes con la estimulación eléctrica en algunas regiones del tálamo, mediante la producción de focos epileptógenos corticales bilaterales con inyección intracerebral de estrógenos,

metrazol o penicilina, o mediante la administración sistémica de penicilina y de GABA.

Modelos animales de *Status Epilepticus*

La administración de algunas sustancias que se emplean como convulsionantes, cuando se administran a dosis elevadas, producen cuadros convulsivos, con periodos interictales muy cortos o un verdadero status epilepticus, con crisis muy intensas y muerte de los animales. Tal es el caso de ácido kaínico, el L-glutamato monosódico, el metrazol, el NMDA, la fluorotilbicuculina y el cloruro de litio intraperitoneal, seguido por inyección de pilocarpina por vía subcutánea.

MECANISMOS BÁSICOS IMPLICADOS EN LA EPILEPSIA

En un determinado foco epiléptico, las neuronas del mismo reciben señales excitatorias (potencial sináptico excitador o PSE), que son amplificadas, ya sea por:

- a) una liberación de mayor cantidad de neurotransmisores excitadores, o porque una mayor cantidad de neuronas recluten impulsos nerviosos y disparen potenciales de acción de manera sincrónica,
- b) que esos grupos neuronales dejen de recibir señales inhibitorias, que contrarresten la actividad de las neuronas excitadoras, por lo que se produce un fenómeno de desinhibición,
- c) que las propiedades fisiológicas de las prolongaciones dendríticas de las neuronas del foco, se modifiquen de tal forma que las señales recibidas se amplifican,
- d) que en esas condiciones, se activen receptores que normalmente no se activan, como los receptores de glutamato tipo NMDA (N-metil-D-aspartato),
- e) que ese grupo de neuronas reciban la acción de neuromoduladores que potencien las señales excitadoras iniciales.

En estas condiciones, una vez que las neuronas del foco epiléptico original, generan una despolarización amplificada, generando así, potenciales de acción que son transmitidos hacia fuera del foco epiléptico, propagándose así, la actividad hacia otros grupos de neuronas. Esta propagación afecta varios grupos neuronales contiguos, aumentando así, la excitabilidad regional y las corrientes iónicas que se generan en los circuitos relacionados con esos grupos neuronales, también son detectadas por

vías contiguas que, a su vez, son excitadas eléctricamente, amplificándose así, aún más la señal (4, 6, 8, 10).

REFERENCIAS

1. Brown TR, Holmes G (Eds) (1999) Handbook of Epilepsy. Lippincott, William & Wilkins. Philadelphia; ed. 2.
2. Carpio A, Hauser WA. (2009) Epilepsy in the developing world. *Curr Neurol Neurosci Rep*; 9:319-326.
3. Feria-Velasco A, Feria-Cuevas Y, Ortiz GG. (2002) Modelos experimentales de epilepsia. En: Muñoz-Hoyos A (Ed) Melatonina. Realidad actual y posibilidades futuras en pediatría. Editorial Formación Alcalá, Alcalá La Real; pp 193-180.
4. Feria-Velasco A, Muñoz de Martínez D, Rubio-Donnadieu F. (1997) Epilepsia. Aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. Cognos Editores, México.
5. García Pedroza F. (1997) La epilepsia como problema de salud pública. En: Feria-Velasco A, Muñoz de Martínez D, Rubio-Donnadieu F (Eds) Epilepsia. Aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. Cap 19; Cognos Editores, México; pp 402-414.
6. Gutiérrez R (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic neurotransmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol*; 84: 3088-3090.
7. Litt B, Esteller R, Echaz J, D'Alessandro M, Shor R, Henry T, Pennell P, Epstein C, Bakay R, Dickter M, Vachsevanos G. (2001) Epileptic seizures may begin hours in advance of clinical onset: a report of five patients. *Neuron*; 30: 51-64.
8. McCormick DA, Contreras D. (2001) On The cellular and network bases of epileptic seizures. *Ann Rev Physiol*; 93: 815-846.
9. Medina-Malo C. (2004) Epilepsias. Diagnóstico y tratamiento. Editorial Mediterráneo, Santiago de Chile.
10. Núñez L, Gutiérrez R. (2009) Epilepsia. En: Mena R (Ed) Neurobiología de los trastornos neuropsiquiátricos más prevalentes en México. CONACYT, CINVESTAV, México. Cap 6, pp. 240-281.
11. Rubio-Donnadieu F. (1997) Aspectos generales y clasificación de la epilepsia. En: Feria-Velasco A, Martínez-De Muñoz D, Rubio-Donnadieu F (Eds) Epilepsia. Aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. Cap 1, Cognos Editores, México; pp 1-24.
12. The Comisión on Classification and Terminology of the Internacional League against Epilepsy. (1989) Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia* 30: 389-398.
13. Yusta IA. (2005) Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. *Emergencias* 17:S68-73.

13

DIAGNÓSTICO ELECTROCLÍNICO E IMAGENOLÓGICO DE LAS EPILEPSIAS

Morales-Chacón LM, Trápaga-Quincoses O.

Programa Cirugía de Epilepsia, Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN),
La Habana, Cuba.

INTRODUCCIÓN

Las epilepsias se caracterizan por un trastorno transitorio de la función cerebral donde se observa frecuentemente una etiología estructural. Comprende más de 40 síndromes clínicos y afecta al 2% de la población mundial. El tratamiento médico inicial logra el control de las crisis en el 50-80% de los pacientes, el 20 % restante se considera medicamente intratable, de los cuales el 5-10% pueden ser candidatos a cirugía (31). Para comprender la epileptogénesis humana y contribuir a la definición de la zona epileptogénica (ZE) resulta de gran importancia la correlación de información estructural y funcional (9).

Existen en la actualidad diversas modalidades para la investigación de la función y estructura cerebral a saber:

- ✓ Las que evalúan la actividad eléctrica cerebral: Electroencefalograma (EEG) y Magnetoencefalograma (MEG).
- ✓ Las técnicas imagenológicas en el tejido cerebral activado: Tomografía por emisión de positrones (PET de sus siglas en ingles), Tomografía por emisión de fotón único (SPECT de sus siglas en ingles) y Resonancia Magnética Funcional (RMNf).
- ✓ Las que ofrecen información metabólica de un área cerebral: Espectroscopia por RMN (ERM).
- ✓ Las que evalúan la estructura o morfología cerebral: Tomografía Axial Computarizada (TAC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

El desarrollo vertiginoso en los últimos decenios de las técnicas de neuroimágenes ha variado notablemente el abordaje de los pacientes con epilepsia, estas técnicas han contribuido a identificar la patología subyacente, y a formular el diagnóstico del síndrome epiléptico. Asimismo, aportan información para orientar el tratamiento clínico y el pronóstico. En los pacientes candidatos a cirugía se utilizan en la localización pre-quirúrgica de la ZE (19). En este capítulo abordaremos la utilidad de estas modalidades funcionales y estructurales en los pacientes con epilepsia.

PAPEL DEL EEG EN LAS EPILEPSIAS

La aplicación del EEG como prueba clínica para identificar la epilepsia representó el avance diagnóstico más importante para esta entidad en el siglo XX, por primera vez una prueba funcional podía distinguir entre áreas cerebrales normales y con anomalías epilépticas. Se observó que la actividad EEGráfica epileptiforme difería entre los tipos de epilepsias. Posteriormente el registro de las descargas epileptiformes interictales e ictales focales se utilizó para identificar la ZE. Se reconoce que el EEG brinda tres tipos de evidencias localizadoras: 1) anomalías epileptiformes interictales, 2) anomalías no epileptiformes interictales y 3) anomalías epileptiformes ictales o en las crisis (48).

Las técnicas neurofisiológicas como el Electroencefalograma y el Magnetoencefalograma ofrecen información dinámica de las redes neurales involucradas en la generación de la actividad epileptiforme ictal e interictal y su interacción con la actividad fisiológica del cerebro.

Esencialmente el EEG puede responder tres interrogantes en el diagnóstico de pacientes con sospecha clínica de epilepsia: 1) confirmar el diagnóstico, 2) evaluar la efectividad de la terapia medicamentosa y 3) localizar la zona epileptogénica.

EEG EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS EPILEPSIAS

La documentación de descargas epileptiformes interictales (DEI) en el EEG ayuda a diferenciar entre eventos paroxísticos de naturaleza epiléptica y no epiléptica. Raramente se registran DEI en sujetos normales: 1,9 a 3,5% de los niños normales, 0,2 a 0,5% de los adultos, en tanto resultan frecuentes en pacientes con epilepsia. Entre el 29-55% de los pacientes tienen DEI en un primer EEG, en caso de que el

estudio resulte normal inicialmente, la repetición permite aumentar la sensibilidad hasta en el 80-90% (1, 5).

Existen otros métodos para incrementar la detección de DEI en el EEG como son: a) la colocación de electrodos adicionales (zigomáticos, temporales anteriores verdaderos T1-T2, y los supraorbitarios), b) la realización de registros prolongados, c) maniobras de hiperventilación y fotoestimulación, d) el sueño que logra incrementar la detección en más de un 40%, en tanto los estudios de privación de sueño la incrementan entre 30- 70% (21, 43).

En función de la localización de las DEI se han descrito diferentes grados de especificidad para el diagnóstico de las epilepsias, que son: 1) **Alta probabilidad de epilepsia** (>85%) en pacientes donde se registren puntas temporales anteriores y medias, puntas de vértice, patrón de hipsarritmia, punta onda lenta, y actividad rápida paroxística generalizada. 2) **Moderada probabilidad de epilepsia** (<75%) en aquellos con puntas frontales, punta onda generalizada (≥ 3 Hz), puntas centrales y occipitales, y respuesta fotoparoxística (48). Aunque la actividad epiléptica interictal se correlaciona altamente con el diagnóstico de epilepsia, sus implicaciones fisiológicas y la relación con la actividad ictal es controversial (54).

EEG EN EL MANEJO DE LA TERAPÉUTICA

El papel del EEG para guiar y monitorear el tratamiento de las epilepsias está menos establecido. En relación con la recurrencia de las crisis, se ha comprobado una correlación positiva entre el control de las crisis clínicas y la cantidad de DEI en la epilepsia con crisis de ausencia, no así en otras epilepsias. Se han descrito determinantes Electroencefalográficos de respuesta a la medicación en las Epilepsias Generalizadas Idiopáticas especialmente en la Epilepsia Mioclónica Juvenil (EMJ) donde la presencia de anomalías focales del EEG se asocia a una menor disminución de las crisis. Todo esto con implicaciones para el manejo de la retirada de la medicación antiepiléptica (MAE)(58).

El EEG también permite evaluar las evoluciones atípicas en algunos síndromes epilépticos como la epilepsia benigna de la infancia con paroxismos centrotemporales, y se utiliza además como instrumento pronóstico para la

predicción de la evolución posquirúrgica en pacientes sometidos a cirugía de epilepsia (32).

EEG EN LA LOCALIZACIÓN DE LA ZONA EPILEPTOGENICA

Para el estudio de la zona epileptogénica se han definido conceptos muy interrelacionados, a saber: zona sintomatogénica, zona de inicio ictal, lesión epileptogénica, zona de déficit funcional y zona epileptogénica; todo esto adquiere especial relevancia en aquellos pacientes con epilepsias farmacorresistentes donde se considera el tratamiento quirúrgico. La zona epileptogénica representa la masa crítica de tejido cuya resección total o desconexión resulta necesaria y suficiente para eliminar las crisis (41).

Para el registro de las anomalías ictales del EEG se ha utilizado el monitoreo prolongado V-EEG. Esta técnica permite correlacionar la actividad eléctrica cerebral con la conducta del paciente durante el evento ictal (Figura 1A), logrando la evaluación precisa de la semiología de las crisis, constituye una prueba muy importante para el diagnóstico de epilepsia y otros eventos episódicos. Es esencial una interacción detallada durante las crisis para caracterizar adecuadamente el evento. Esta técnica permite diferenciar las pseudocrisis de las crisis epilépticas, documentar la presencia de ambas y determinar la zona de inicio ictal durante la evaluación prequirúrgica. Entre el 5-20% de los pacientes referidos por epilepsia tienen pseudocrisis (4).

Con el objetivo de disminuir la duración y el costo del monitoreo prolongado en Video-EEG, sin afectar su utilidad en la definición de la ZE, se utiliza la disminución y retirada de la MAE en las Unidades de Monitoreo de epilepsia. Sin embargo, no existe consenso, en el esquema óptimo para lograr dicho objetivo. Se ha demostrado que la retirada rápida de la MAE aumenta la incidencia de todos los tipos de crisis (10). Morales y colaboradores, reportaron que el incremento de la frecuencia de las crisis no ocurre en el periodo de decremento rápido de los niveles séricos de MAE, sino en la fase de estabilización del nivel subterapéutico (42).

El monitoreo Video-EEG se puede realizar mediante la colocación de electrodos extra e intracraneales. La utilización de electrodos extracraneales adicionales, y otros, colocados mediante técnicas semi-invasivas, como los esfenoideales y

nasofaríngeos, permiten estimar mejor el área donde se originan las crisis. Los registros considerados invasivos, ya sea, utilizando electrodos subdurales o profundos, ofrecen información casi directamente de los generadores de los potenciales, lo que incrementa ostensiblemente la sensibilidad de la prueba. Sin embargo, tienen limitaciones, por el hecho de registrar casi exclusivamente del sitio donde están ubicados (18). Deben utilizarse para explorar el origen de las crisis, solo cuando una investigación no invasiva exhaustiva, resulta incongruente, y es necesario entonces probar una hipótesis determinada, tal es el caso de pacientes con patología dual (2, 52, 60).

PATRONES ELECTROENCEFALOGRÁFICOS ICTALES DE LAS CRISIS GENERALIZADAS

Crisis tónica clónica

- Fase tónica: Actividad generalizada de bajo voltaje, con actividad rápida 20-40Hz interpuesta.
- Fase clónica: Ritmo reclutante entremezclado con ondas lentas, que disminuyen de frecuencia. Poscrítico: Aplanamiento, seguido de ondas lentas.

Crisis clónicas: Actividad rápida a 10 o más Hz entremezclada con actividad lenta.

Crisis tónicas: a) Atenuación generalizada del voltaje, b) actividad rápida 15-25 Hz, o c) la mezcla de ambas.

Crisis atónicas: a) Paroxismos generalizados, bilaterales y sincrónicos, en forma de punta onda (PO) o polipunta onda (PPO), b) atenuación generalizada y severa de voltaje, o c) trenes de baja o alta amplitud de frecuencia alta. Estos pueden presentarse solos o combinados.

Ausencia típica: Actividad paroxística generalizada PO a 3 Hz, bilateral, sincrónica y, simétrica.

Ausencia atípica: Actividad paroxística generalizada PO a 1.5-2.5 Hz. Con menor frecuencia actividad rápida 10-20 Hz.

Crisis mioclónicas: Paroxismos generalizados, bilaterales y sincrónicos. A forma de (PO), (PP) y (PPO). En la EMJ trenes de PPO 3-4Hz. Las mioclonias también ocurren asociadas a trenes de espigas rítmicas con una frecuencia de 10-16 Hz.

Espasmo Infantil: Atenuación brusca del voltaje o desincronización de la actividad de base.

En las epilepsias generalizadas con frecuencia el patrón ictal es indistinguible del ictal. Se reconoce en la actualidad la existencia de un *continuum* entre el estado interictal e ictal, tanto para las epilepsias generalizadas como para las focales (16).

PATRONES ELECTROENCEFALOGRÁFICOS ICTALES EN LAS CRISIS PARCIALES

- Puntas interictales focales que se hacen rítmicas y pueden mantenerse como descargas a ondas lentas angulares que se propagan a electrodos vecinos.
- Evolución gradual de la actividad rítmica dentro de una de las bandas de frecuencias convencionales del EEG con ulterior propagación a electrodos vecinos.
- Supresión o atenuación generalizada o lateralizada de la actividad de base sucedida por actividad rítmica.

En la última década se han añadido otros tipos de inicio ictal: a) Registro de actividad infralenta; y b) Registro de actividad de alta frecuencia ≥ 80 Hz (oscilaciones de alta frecuencia (OAF): se observaron inicialmente solamente en registros intracraneales por su indistinguible confusión con la actividad muscular del cuello (51). Se plantea además que las OAF pudieran constituir un mejor marcador de la enfermedad que la actividad de puntas, y que la evaluación del EEG entre los 100 y 500 Hz puede añadir información clínica útil para la interpretación clásica del EEG intracerebral (24).

El EEG con electrodos extracraneales o de superficie permite localizar el inicio ictal en aproximadamente el 72% de los casos, el valor localizador del EEG ictal es mayor en las epilepsias localizadas en el lóbulo temporal que en las extratemporales. En el 57% de las crisis se puede documentar un inicio lateralizado, siendo más común en la epilepsia del lóbulo temporal medial (ELTM), y en la epilepsia frontal lateral. Se reporta falsa lateralización-localización en crisis occipitales y en el 16% de las parietales (20).

El monitoreo Video-EEG permite definir si la lesión focal; demostrada por imágenes, es compatible con el tipo de crisis del paciente y con los hallazgos interictales e ictales del EEG (50). Sin embargo, la relación entre la lesión y las DEI es muy compleja. Por otro lado, se conoce que la zona epileptogénica no consiste solo en la lesión epileptogénica demostrada por la imagen estructural, existe además una zona adicional que rodea la lesión. De lo anterior se desprende que la extensión de la zona epileptogénica es difícil de determinar con los métodos disponibles en la actualidad (41). A pesar de las limitaciones, se postula que la combinación del monitoreo prolongado V-EEG con la optimización de estudios imagenológicos, logra con frecuencia resolver el problema de localización de la ZE.

NEUROIMÁGENES ESTRUCTURALES EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS EPILEPSIAS

El reconocimiento de que anomalías estructurales cerebrales representan sustratos potenciales de crisis epilépticas ha estado presente desde el inicio de la era moderna, sin embargo el rol de las neuroimágenes cuando se considera el tratamiento quirúrgico, ha variado considerablemente a través de los años. Inicialmente, las anomalías estructurales constituían el principal indicador de la localización de la ZE. Con el advenimiento del EEG fue posible la identificación directa de la epileptogenicidad, y las neuroimágenes estructurales fueron relegadas a un rol confirmatorio. El avance reciente en estas tecnologías ha convertido nuevamente las neuroimágenes en vanguardia, y se postula que el EEG podrá asumir un papel confirmatorio en muchas epilepsias.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La RMN resulta la modalidad imagenológica estructural de elección en pacientes con epilepsia. La Tomografía Axial Computarizada (TAC) puede ser de utilidad como técnica complementaria para las calcificaciones corticales y en situaciones agudas para descartar lesiones groseras.

Las imágenes de RMN han demostrado alta sensibilidad y especificidad para detectar lesiones estructurales sobre todo en las Epilepsias Focales. La sensibilidad de la RMN para detectar anomalías está asociada a la secuencia utilizada y a la experiencia del neuroradiólogo. Es una herramienta que posee múltiples ventajas

sobre la TAC entre las cuales sobresale la mayor definición de las estructuras cerebrales, y la posibilidad de realizar diferentes secuencias que resaltan los contrastes entre los tejidos del cerebro: a) *Secuencia ponderada en T1*, b) *Secuencia ponderada en T2*, c) *Secuencia FLAIR (Fluid-Attenuated Inversion Recovery del inglés)*. Cada examen de RMN debe comprender al menos tres secuencias y tres orientaciones diferentes (planos sagital, coronal y transversal).

Los hallazgos que se detectan con mayor frecuencia en adultos son: la atrofia hipocampal, los tumores de bajo grado, y las malformaciones del desarrollo cortical (MDC), mientras que en niños e infantes estas últimas son las frecuentes (37).

La esclerosis hipocampal es el sustrato neuropatológico más frecuente de la Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT). En la RMN se describe como atrofia hipocampal, incremento de la señal en T2 y en la secuencia FLAIR en las regiones mesiales, así como decremento de la señal inversión- recuperación (Figura 1B). Otros signos de atrofia temporal son: a) atrofia ipsilateral del giro parahipocampal y lóbulo temporal inferior, b) pérdida de la demarcación sustancia gris-sustancia blanca del lóbulo temporal ipsilateral, c) pérdida de la estructura interna del hipocampo, d) aumento del asta temporal del ventrículo lateral y e) pérdida de visibilidad de las indentaciones en la parte superior de la cabeza del hipocampo (12, 47).

En los últimos años se han desarrollado las imágenes RMN de alta resolución con nuevos métodos de procesamiento como la morfometría basada en vóxeles que permiten cuantificar las alteraciones vóxel a vóxel logrando identificar lesiones sutiles como las DCF ligeras que pueden escapar al análisis visual (34) (Figura 1C). Otras como las imágenes por tensor de difusión brindan información detallada de la arquitectura cerebral y permiten visualizar los tractos anatómicos de sustancia blanca *in vivo*, así como predecir las anomalías en las conexiones intra e interhemisféricas relacionadas con la generación y propagación de las crisis epilépticas (7, 27, 65).

NEUROIMÁGENES FUNCIONALES EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS EPILEPSIAS

A diferencia de la TAC y la RMN, las exploraciones tomográficas de la medicina nuclear, la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía por emisión

de positrones de fotón único (SPECT), se obtienen tras la administración de radio-trazadores que aportan una información funcional o metabólica de un órgano o sistema.

En la década del 1980, en virtud de su mayor disponibilidad, menor complejidad y costos sensiblemente inferiores, se comenzó a investigar el papel del SPECT como marcador de flujo sanguíneo cerebral regional en la detección de la ZE (64). Los estudios de SPECT en las epilepsias se llevan a cabo a través de trazadores del flujo sanguíneo, estos pueden ser el hexametil-propilen-amino oxima (HMPAO) o el dímero de etilcisteína (ECD). Estas sustancias se marcan con un isótopo radiactivo, que en ambos casos es el ^{99m}Tc para poder detectarse en los equipos convencionales de Medicina Nuclear. La inyección del radiofármaco se debe realizar en una habitación cómoda y con personal especializado, sin embargo se dificulta la realización por la corta vida media del radiofármaco.

Así pues, se habla de SPECT interictal cuando la inyección del trazador se realiza con el paciente en condiciones basales, en reposo y estando libre de crisis durante un periodo de tiempo superior a 24 horas. A diferencia del SPECT interictal, en el SPECT ictal la inyección del ^{99m}Tc -HMPAO se lleva a cabo durante la crisis epiléptica y las imágenes gammagráficas pueden adquirirse hasta 2 horas después, una vez solucionada la crisis epiléptica (Figura 1E). Esta técnica se utiliza fundamentalmente en la evaluación prequirúrgica de los candidatos a cirugía de la epilepsia. La inyección del ligando en los primeros 20 segundos de la crisis brinda los mejores resultados (39), con tiempos de inyecciones relativamente mayores, lo que se observa es la propagación más que la zona de inicio ictal (45). Actualmente, se sugiere la interpretación simultánea del SPECT ictal y el patrón de propagación del EEG en el momento de la inyección (66).

En varios estudios de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal se ha demostrado la superioridad del SPECT ictal en comparación con el interictal para la identificación y la lateralización de la zona de déficit funcional. Se indica una sensibilidad entre el 73 y el 97% para el SPECT ictal, hasta 90% en la ELT con puntas unilaterales en el EEG, 55% en ELT con puntas bilaterales. Se reporta 50% de sensibilidad para el interictal, aunque en un 10 % el SPECT interictal puede señalar

hipoperfusión en la región temporal contralateral mostrando una falsa lateralización (23, 35, 53, 66).

En las epilepsias extratemporales la sensibilidad del SPECT interictal es <25% y para el ictal los pocos estudios realizados reportan un 66% (22, 28). La sensibilidad global del SPECT ictal para determinar aumento del flujo sanguíneo cerebral es similar, o ligeramente inferior a la del EEG de superficie. Sin embargo, es claramente inferior a la de los registros de EEG invasivos (57) y es directamente proporcional a la precocidad de inyección del radio fármaco (23, 67).

La precisión de los análisis del SPECT ictal es mayor cuando se comparan los datos de perfusión ictal e interictal (67). Esto puede llevarse a cabo mediante el procesamiento de los datos a través de herramientas cuantitativas. Así se ha desarrollado el SPECT ictal e interictal co-registrado con RMN (SISCOM del inglés), el cual ha representado una importante contribución al mejorar la capacidad para definir la extensión de lesiones epileptogénicas y regionalizar las zonas potencialmente epileptogénicas en pacientes con RMN normales (23, 63).

La tomografía por emisión de positrones (PET) es un método nuclear versátil que provee información dinámica, funcional y metabólica del cerebro (17). Permite la imagen cuantificable de diferentes sistemas de neuroreceptores cerebrales como GABA, serotonina, opiodes y dopamina. Recién se introduce en la clínica el rol de estos neurotransmisores en la evaluación de la epileptogénesis, de la propagación de la actividad epiléptica durante las crisis, y en la definición de la zona de inicio ictal en la evaluación prequirúrgica de los candidatos a cirugía. El PET con fluordesoxiglucosa marcada con flúor18 (¹⁸F-FDG) ha sido el más estudiado, este metabolito penetra en las células cerebrales y queda atrapado, reflejando el nivel del metabolismo local de la glucosa y la actividad de las hexoquinasas. La dinámica temporal del PET es más lenta que el cambio del flujo sanguíneo detectada en el SPECT por lo que la gran mayoría de los estudios de PET reportan imágenes del estado interictal. Las imágenes de PET se caracterizan por una depresión localizada de la glucosa cerebral que se correlaciona con la zona de inicio ictal en el EEG de pacientes con epilepsias focales (36, 38).

Estudios realizados en pacientes con ELT muestran zonas de hipometabolismo durante el estado interictal en cerca del 70 y 80 % de los casos. Estas zonas

implican usualmente regiones circunscritas o lobulares, aunque pueden abarcar zonas más amplias multilobulares, en este caso el lóbulo o zona de comienzo de las crisis es la región de más hipometabolismo. La especificidad del PET en relación con los resultados del EEG es del 86 % y la sensibilidad del 84% en las epilepsias temporales, mientras que la sensibilidad baja a un 33% y la especificidad se comporta en un 95% en las epilepsias extratemporales (15, 55).

Los estudios de PET ictales son muy difíciles de realizar, por dificultades logísticas entre otras vida media corta del ^{18}F -FDG de 110 min. Solo se han efectuados en pacientes con una alta frecuencia de crisis o en status epiléptico no convulsivo. Los estudios ictales realizados de forma fortuita muestran en la zona de inicio ictal un marcado hipermetabolismo cerebral de la glucosa (59). En general en la ELT alcanza una sensibilidad 70-85%, adquiriendo mayor utilidad cuando las imágenes de RMN son normales. El PET lateraliza la lesión correctamente en el 80% de los casos (23).

ESPECTROSCOPIA POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Como se ha explicado la RMN ocupa una posición destacada en el estudio y diagnóstico de las epilepsias. Ello tiene su razón de ser no sólo en el exquisito detalle morfológico de las imágenes convencionales de RMN, sino también, en la capacidad de esta técnica, en concreto, la Espectroscopia por Resonancia Magnética (ERM) para evidenciar trastornos metabólicos cerebrales, aunque éstos cursen con escaso o nulo reflejo en la imagen morfológica. Esta potencialidad hace de la ERM una técnica de gran atractivo en casos de epilepsia fármaco resistentes que precisan de soluciones quirúrgicas.

La ERM permite también la evaluación de la zona de déficit funcional en pacientes epilépticos al evaluar in vivo la composición metabólica del cerebro. La misma ofrece información química de los compuestos que están presentes en concentraciones mucho menores que el H_2O en los tejidos. Permite medir sobre la región de interés, diferentes componentes que incluyen el N-acetil-aspartato, (NAA), la colina (Cho), la creatinina (Cr) y el lactato. La corteza patológica presenta concentraciones anormales de estos metabolitos, se reporta una disminución del NAA en pacientes con ELT y extratemporal (33).

El NAA es una sustancia intracelular encontrada en todas las neuronas maduras del cerebro. Se produce en la mitocondria neuronal vía N acetil aspartato y se degrada por la aminohidrolasa. La Cho es una sustancia relacionada con el metabolismo de membrana y brinda información sobre procesos proliferativos; también se encuentra la creatina, la cual se relaciona con el metabolismo energético (40). En los pacientes con ELT se reporta que la señal del NAA esta disminuida, en tanto, la Cho esta normal o aumentada ipsilateral a la zona epileptogénica (14, 46) (Figura 1D). Evidencias empíricas indican que la ERM puede ofrecer información adicional para el diagnóstico y evaluación de estrategias terapéuticas en pacientes con epilepsia (11, 13, 30).

EEG CUANTITATIVO

En la actualidad, cuando el registro EEGráfico de superficie no es concluyente y los resultados de otras investigaciones no son congruentes, se plantea entonces la colocación de electrodos intracraneales. Aunque la morbilidad asociada a la implantación de dichos electrodos es baja, resulta comparable con la de la cirugía para la resección del tejido epileptogénico, es así que se han difundido otras alternativas relacionadas con el análisis cuantitativo del EEG (6). De forma general, el análisis cuantitativo del EEG en las epilepsias se utiliza para la estimación del efecto de las drogas antiepilépticas en el Sistema Nervioso Central, se reporta modificación global en la composición de frecuencias del EEG en pacientes con epilepsias focales. Además, se utiliza en la detección automática de actividad epileptiforme ictal e interictal durante el monitoreo prolongado Vídeo-EEG, y en el análisis topográfico durante la evaluación prequirúrgica (26).

Las estimación de las fuentes generadoras del EEG sobre imágenes de RMN han transformado el análisis convencional del EEG en una imagen tridimensional para la localización de las fuentes de actividad epiléptica (49), esta técnica permite la investigación de cambios dinámicos de las redes neuronales con una resolución temporal de milisegundos.

El problema de estimar la localización de los generadores de la actividad eléctrica del cerebro, a partir de las mediciones de voltaje en el cuero cabelludo denominado Problema Inverso (PI) se ha abordado por nuestro grupo, aplicando un software

desarrollado en el Centro de Neurociencias de Cuba (CNC), capaz de determinar las distribuciones de corrientes corticales que generan la actividad registrada en pacientes con epilepsias focales farmacorresistentes (8, 44) (Figura 1F).

Aunque se espera que el análisis cuantitativo del EEG y especialmente la estimación de sus fuentes generadoras (métodos de localización de fuentes), ya sea, utilizando dipolos o soluciones inversas distribuidas reemplacen la utilización de registros intracraneales, lo cierto es que esto no ha ocurrido debido en lo fundamental, a las dificultades para aplicar estas técnicas a la actividad epileptiforme ictal (3). Con los avances recientes en la metodología y la validación clínica, la estimación de las fuentes generadoras del EEG se utiliza para mapear la actividad epileptiforme, así como la respuesta evocada a estímulos externos.

EEG- RMNf

Por su capacidad para mostrar cambios hemodinámicos enlazados temporalmente con la actividad epiléptica en el cerebro, la RMNf correlacionada con el registro del EEG (EEG- RMNf) resulta la contraparte natural de las imágenes de estimación de fuentes del EEG. Esta modalidad emergió desde finales de los 90 como técnica de imagen cerebral no invasiva, basada en el registro del EEG (25, 29).

La capacidad para diferenciar las puntas interictales que indican la zona epileptogénica, de aquellas, que son propagadas o emanan de un foco secundario incapaz de generar crisis espontáneas (el llamado problema de las puntas rojo/verde), adquiere un significado práctico crucial, con el desarrollo de metodologías que permiten la combinación del EEG con la RMNf. Estas pueden contribuir a delimitar la ZE para la resección quirúrgica utilizando la información del EEG interictal. Existe actualmente una razón para creer que esto podría ser posible con RMNf, pues la realización de registros con microelectrodos en hipocampos epileptogénicos, de ratas y humanos, revelan oscilaciones breves de alta frecuencia (200-500Hz) en las puntas interictales registradas en las áreas que generan las crisis espontáneas (56). Significa entonces, que el mecanismo fisiopatológico responsable de estos eventos epileptiformes interictales es diferente a aquellos que subyacen a los que son propagados, o están asociados con tejidos insuficientemente epileptogénicos para generar crisis epilépticas. La señal

metabólica de estos, puede ser fisiopatológicamente diferente, y resultaría entonces identificable en estudios de RMNf (24).

Constituye entonces una técnica que permite evaluar los cambios hemodinámicos asociados con la actividad cerebral espontánea en redes neuronales epilépticas, incluyendo cambios subcorticales. Se espera que estas nuevas técnicas de imágenes mejoren el manejo de los candidatos para cirugía de epilepsia. Recientemente, se han desarrollado estrategias para combinar la estimación de las fuentes generadoras del EEG con la RMNf correlacionada con el EEG, con el objetivo de estudiar la organización espacial y temporal de las redes epilépticas y su interacción con la actividad cerebral de base (61, 62).

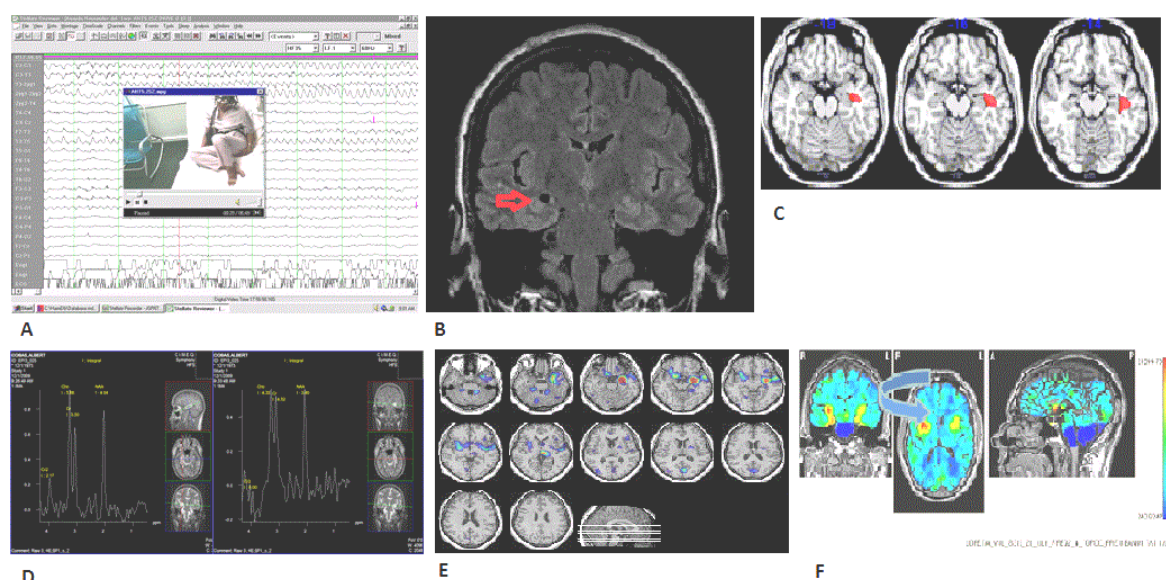


Figura 1. A) Segmento Video-EEG en montaje bipolar que demuestra inicio ictal tipo actividad rítmica theta en región temporal del hemisferio izquierdo. B) Corte coronal de RMN de un paciente con epilepsia del lóbulo temporal mesial donde se observa atrofia hipocampal derecha. C) Imagen de RMN con morfometría basada en vóxel mostrando en color rojo zonas con decremento de la sustancia gris en región hipocampal izquierda. D) Espectroscopia por RMN (vóxel hipocampal) que evidencia disminución significativa de la relación NAA/Cho ipsilateral a la zona epileptogénica en paciente con ELT. E) Imagen de SPECT ictal co-registrada con RMN (SISCOM) que evidencia zona de inicio ictal mesial derecha (en color rojo) en paciente con ELT. F) Generadores de fuentes del patrón EEG ictal (se indica con flecha) en paciente con ELT estimado con software especializado diseñado en el Centro de Neurociencias de Cuba (Solución LORETA sobre cerebro individual). Fuente: Programa Cirugía de Epilepsia, Centro Internacional de Restauración Neurológica, Habana, Cuba)

CONCLUSIONES

Los métodos de imágenes abordados en este capítulo RMN, SPECT, PET y RMNf pueden conjuntarse con métodos electrofisiológicos (EEG y MEG), y obtener una información más detallada y completa de la función cerebral en los pacientes

epilépticos. La combinación de estas modalidades (imágenes multimodales) ha demostrado utilidad en la práctica clínica y en la comprensión de la neurobiología de las epilepsias.

REFERENCIAS

1. Ahmed SN, Unterman J, McCloskey B, et al. Clinical significance of photic stimulation during routine EEGs of adult patients. *Am J Electroneurodiagnostic Technol* 2006; 46(4): 356-62.
2. Akman CI, Montenegro MA, Jacob S, et al. Subclinical seizures in children diagnosed with localization-related epilepsy: clinical and EEG characteristics. *Epilepsy Behav* 2009; 16(1): 86-98.
3. Bassam B, Assaf BA, Ebersole JS. Visual and Quantitative Ictal EEG Predictors of Outcome After Temporal Lobectomy. *Epilepsia* 1999; 40(1): 52-61.
4. Benbadis SR, Chichkova R. Psychogenic pseudosyncope: an underestimated and provable diagnosis. *Epilepsy Behav* 2006; 9(1): 106-10.
5. Benbadis SR, Lin K. Errors in EEG interpretation and misdiagnosis of epilepsy. Which EEG patterns are overread? *Eur Neurol* 2008; 59(5): 267-71.
6. Betting LE, Li LM, Lopes-Cendes I, et al. Correlation between quantitative EEG and MRI in idiopathic generalized epilepsy. *Hum Brain Mapp* 2010; [Epub ahead of print].
7. Bonilha L, Montenegro MA, Rorden C, et al. Voxel-based morphometry reveals excess gray matter concentration in patients with focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2006; 47(5): 908-15.
8. Bosch-Bayard J, Valdes-Sosa P, Virues-Alba T, et al. 3D statistical parametric mapping of EEG source spectra by means of variable resolution electromagnetic tomography (VARETA). *Clin Electroencephalogr* 2001; 32(2): 47-61.
9. Brazdil M, Mikl M, Chlebus P, et al. Combining advanced neuroimaging techniques in presurgical workup of non-lesional intractable epilepsy. *Epileptic Disord* 2006; 8(3): 190-4.
10. Britton JW. Significance of the EEG and Epileptiform Abnormalities in Antiepileptic Drug Discontinuation. *J Clin Neurophysiol* 2010; [Epub ahead of print].
11. Campos BA, Yasuda CL, Castellano G, et al. Proton MRS may predict AED response in patients with TLE. *Epilepsia* 2010; 51(5): 783-8.
12. Cascino G, Jack CJ, Parisi J, et al. Magnetic resonance imaging- based volume studies in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. *Ann Neurol* 1991; 30: 31-6.
13. Cendes F, Andermann F, Dubeau F, et al. Proton Magnetic-Resonance Spectroscopic Images and Mri Volumetric Studies for Lateralization of Temporal-Lobe Epilepsy. *Magnetic Resonance Imaging* 1995; 13(8): 1187-91.
14. Cendes F, Caramanos Z, Andermann F, et al. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging and magnetic resonance imaging volumetry in the lateralization of temporal lobe epilepsy: a series of 100 patients. *Ann Neurol* 1997; 42(5): 737-46.
15. Chassoux F, Landre E, Rodrigo S, et al. Intralesional recordings and epileptogenic zone in focal polymicrogyria. *Epilepsia* 2008; 49(1): 51-64.
16. Claassen J. How I treat patients with EEG patterns on the ictal-interictal continuum in the neuro ICU. *Neurocrit Care* 2009; 11(3): 437-44.
17. DeCarli C, McIntosh A, Blaxton T. Use of positron emission tomography for the evaluation of epilepsy. *Neuroimaging Clin N Am* 1995; 5: 623-45
18. Dewar S, Passaro E, Fried I, et al. Intracranial electrode monitoring for seizure localization: indications, methods and the prevention of complications. *J Neurosci Nurs* 1996; 28(5): 280-92.
19. Duncan J. The current status of neuroimaging for epilepsy. *Curr Opin Neurol* 2009; 22(2): 179-84.
20. Foldvary N. Symptomatic focal epilepsies. In: Wyllie E, ed. *The treatment of epilepsy. Principles and practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:467-74.
21. Fountain NB, Freeman JM. EEG is an essential clinical tool: pro and con. *Epilepsia* 2006; 47 Suppl 1:23-5.
22. Fukuda M, Masuda H, Honma J, et al. Ictal SPECT in supplementary motor area seizures. *Neuro Res* 2006; 28(8): 845-8.
23. Goffin K, Dedeurwaerdere S, Van LK, et al. Neuronuclear assessment of patients with epilepsy. *Semin Nucl Med* 2008; 38(4): 227-39.
24. Gotman J. High frequency oscillations: the new EEG frontier? *Epilepsia* 2010; 51 Suppl 1:63-5.

25. Gotman J, Kobayashi E, Bagshaw AP, et al. Combining EEG and fMRI: a multimodal tool for epilepsy research. *J Magn Reson Imaging* 2006; 23(6): 906-20.
26. Greene BR, Faul S, Marnane WP, et al. A comparison of quantitative EEG features for neonatal seizure detection. *Clin Neurophysiol* 2008; 119(6): 1248-61.
27. Gross DW, Bastos A, Beaulieu C. Diffusion tensor imaging abnormalities in focal cortical dysplasia. *Can J Neurol Sci* 2005; 32(4): 477-82.
28. Gupta A, Raja S, Kotagal P, et al. Ictal SPECT in children with partial epilepsy due to focal cortical dysplasia. *Pediatr Neurol* 2004; 31(2): 89-95.
29. Hamandi K, Powell HW, Laufs H, et al. Combined EEG-fMRI and tractography to visualise propagation of epileptic activity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79(5): 594-7.
30. Hammen T, Schwarz M, Doelken M, et al. 1H-MR spectroscopy indicates severity markers in temporal lobe epilepsy: correlations between metabolic alterations, seizures, and epileptic discharges in EEG. *Epilepsia* 2007; 48(2): 263-9.
31. Hauser W. Incidence and prevalence. In: Engel JJ, Pedley TA, eds. *Epilepsy: A comprehensive Textbook*. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 1999.
32. Hildebrandt M, Schulz R, Hoppe M, et al. Postoperative routine EEG correlates with long-term seizure outcome after epilepsy surgery. *Seizure* 2005; 14(7): 446-51.
33. Holopainen IE, Lundbom NM, Metsahonkala EL, et al. Temporal lobe pathology in epilepsy: proton magnetic resonance spectroscopy and positron emission tomography study. *Pediatr Neurol* 1997; 16(2): 98-104.
34. Keller SS, Roberts N. Voxel-based morphometry of temporal lobe epilepsy: An introduction and review of the literature. *Epilepsia* 2008; 49(5): 741-57.
35. Krausz Y, Cohen D, Konstantini S, et al. Brain SPECT imaging in temporal lobe epilepsy. *Neuroradiology* 1991; 33: 274-6.
36. Kuhl DE, Engel J, Jr., Phelps ME, et al. Epileptic patterns of local cerebral metabolism and perfusion in humans determined by emission computed tomography of 18FDG and 13NH3. *Ann Neurol* 1980; 8(4): 348-60.
37. Kuzniecky RI. Magnetic resonance imaging in developmental disorders of the cerebral cortex. *Epilepsia* 1994; 35 Suppl 6: S44-S56.
38. la Fougère C, Rominger A, Forster S, et al. PET and SPECT in epilepsy: a critical review. *Epilepsy Behav* 2009; 15(1): 50-5.
39. Lee S, Lee S, Yun C, et al. Ictal SPECT in neocortical epilepsies: clinical usefulness and factors affecting the pattern of hyperperfusion. *Neuroradiology* 2006; 48: 678-84.
40. Li LM, Cendes F, Andermann F, et al. Spatial extent of neuronal metabolic dysfunction measured by proton MR spectroscopic imaging in patients with localization-related epilepsy. *Epilepsia* 2000; 41(6): 666-74.
41. Luders HO, Najm I, Nair D, et al. The epileptogenic zone: general principles. *Epileptic Disord* 2006; 8 Suppl 2:S1-9.: S1-S9.
42. Morales Chacon L, Perez D, Fontela M, et al. Niveles sanguíneos de drogas antiepilépticas durante el monitoreo prolongado Video-EEG ... *Rev Mex Neuroci* 2004; 5(2): 120-6.
43. Morales Chacon L, Zaldivar M. Utilización de electrodos cigomáticos en la evaluación de pacientes epilépticos. Presentación de una metodología para el registro y evaluación del EEG digital. *Revista de Neurología* 1999; 28: 224-7.
44. Morales-Chacon LM, Bosch-Bayard J, Bender-del Busto JE, et al. [Video-EEG evaluation complemented by spectral and EEG source analysis in patients with medication-resistant medial temporal lobe epilepsy]. *Rev Neurol* 2007; 44(3): 139-45.
45. Newton M, Berkovic S, Austin M, et al. Postictal switch in blood flow distribution and temporal lobe seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 891-4.
46. Ng TC, Comair YG, Xue M, et al. Temporal lobe epilepsy: presurgical localization with proton chemical shift imaging. *Radiology* 1994; 193(2): 465-72.
47. Oppenheim C, Dormont D, Biondi A, et al. Loss of digitations of the hippocampal head on high-resolution fast spinecho MR: a sign of mesial temporal sclerosis. *Am J Neuroradiol* 1998; 19: 457-63.
48. Pillai J, Sperling MR. Interictal EEG and the diagnosis of epilepsy. *Epilepsia* 2006; 47 Suppl 1:14-22.: 14-22.
49. Plummer C, Harvey AS, Cook M. EEG source localization in focal epilepsy: where are we now? *Epilepsia* 2008; 49(2): 201-18.

50. Quesney LF, bou-Khalil B, Cole A, et al. Pre-operative extracranial and intracranial EEG investigation in patients with temporal lobe epilepsy: trends, results and review of pathophysiologic mechanisms. *Acta Neurol Scand Suppl* 1988; 117: 52-60
51. Rodin E, Constantino T, Rampp S, et al. Seizure onset determination. *J Clin Neurophysiol* 2009; 26(1): 1-12.
52. Salanova V, Markand O, Worth R. Temporal lobe epilepsy: analysis of patients with dual pathology. *Acta Neurol Scand* 2004; 109(2): 126-31.
53. Spanaki MV, Spencer SS, Corsi M, et al. Sensitivity and specificity of quantitative difference SPECT analysis in seizure localization. *J Nucl Med* 1999; 40(5): 730-6.
54. Spencer S, Huh L. Outcomes of epilepsy surgery in adults and children. *Lancet Neurol* 2008; 7(6): 525-37.
55. Spencer S. The relative contributions of MRI, SPECT, and PET imaging in epilepsy. *Epilepsia* 1994; 35: 72-89.
56. Staba RJ, Wilson CL, Bragin A, et al. Quantitative analysis of high-frequency oscillations (80-500 Hz) recorded in human epileptic hippocampus and entorhinal cortex. *J Neurophysiol* 2002; 88(4): 1743-52.
57. Stefan H, Hopp P, Platsch G, et al. SPECT: ictal perfusion in localization-related epilepsies. *Adv Neurol* 2000; 83:41-50.: 41-50.
58. Szaflarski JP, Lindsell CJ, Zakaria T, et al. Seizure control in patients with idiopathic generalized epilepsies: EEG determinants of medication response. *Epilepsy Behav* 2010; 17(4): 525-30.
59. Theodore W, Newmark M, Sato S. 18F-fl uorodeoxyglucose positron emission tomography in refractory complex partial seizures. *Ann Neurol* 1983; 14: 429-37.
60. Urasaki E, Yokota A, Akamatsu N, et al. [Surgical treatment of medically intractable temporal lobe epilepsy--fundamental technique and tips for implantation of intracranial electrodes and tailored temporal lobectomy]. *J UOEH* 2004; 26(3): 303-14.
61. Vulliemoz S, Lemieux L, Daunizeau J, et al. The combination of EEG source imaging and EEG-correlated functional MRI to map epileptic networks. *Epilepsia* 2010; 51(4): 491-505.
62. Vulliemoz S, Rodionov R, Carmichael DW, et al. Continuous EEG source imaging enhances analysis of EEG-fMRI in focal epilepsy. *Neuroimage* 2010; 49(4): 3219-29.
63. Wichert-Ana L, de Azevedo-Marques PM, Oliveira LF, et al. Ictal technetium-99 m ethyl cysteinate dimer single-photon emission tomographic findings in epileptic patients with polymicrogyria syndromes: a subtraction of ictal-interictal SPECT coregistered to MRI study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(6): 1159-70.
64. Wieser HG. PET and SPECT in epilepsy. *Eur Neurol* 1994; 34 Suppl 1:58-62.: 58-62.
65. Yogarajah M, Powell HW, Parker GJ, et al. Tractography of the parahippocampal gyrus and material specific memory impairment in unilateral temporal lobe epilepsy. *Neuroimage* 2008; 40(4): 1755-64.
66. Zaknun JJ, Bal C, Maes A, et al. Comparative analysis of MR imaging, ictal SPECT and EEG in temporal lobe epilepsy: a prospective IAEA multi-center study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(1): 107-15.
67. Zubal IG, Spencer SS, Imam K, et al. Difference images calculated from ictal and interictal technetium-99m-HMPAO SPECT scans of epilepsy. *J Nucl Med* 1995; 36(4): 684-9.

DÉFICIT COGNITIVO EN LA EPILEPSIA: DE LA CLÍNICA A LA ELECTROFISIOLOGÍA

García-Navarro ME, Báez-Martín MM.

Programa Cirugía de Epilepsia, Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN),
La Habana, Cuba.

NEUROPSICOLOGÍA Y EPILEPSIA

La neuropsicología, como neurociencia conductual, se interesa por estudiar, tratar de comprender y explicar las relaciones entre el cerebro, las actividades mentales superiores y el comportamiento (43). De esta definición se deriva una de las funciones de esta disciplina en su expresión clínica, estudiar la repercusión del daño cerebral sobre estos aspectos (funciones psíquicas/comportamiento), en pacientes con enfermedad neurológica.

Dentro de las patologías en las que se estudia esta relación, está la epilepsia, la cual para la mayor parte de la comunidad científica internacional, cursa con cierto deterioro de las funciones cognitivas (7, 30). Este deterioro se considera influenciado por múltiples factores que actúan conjuntamente, entre los que se destacan la edad de inicio, años de duración, tipos y frecuencia de crisis, terapia farmacológica (7) y topografía de la zona epileptogénica (14).

El tratamiento para el control de las crisis epilépticas es predominantemente farmacológico, sin embargo éste no resulta efectivo en todos los pacientes, resultando la opción quirúrgica una alternativa de tratamiento para la población epiléptica farmacorresistente (4). Esta opción no sólo reduce o elimina las crisis, sino que detiene el deterioro cognitivo asociado a la cronicidad de la epilepsia (4). No obstante, puede conducir a afectación cognitiva secundaria (39, 46), en dependencia del área de resección, convirtiéndose para la población

farmacorresistente, en otra variable que influye en el desempeño cognitivo, adicionándose a las ya antes mencionadas.

Al retomar de manera individual estos factores, destacamos la relación entre inicio temprano de las crisis y pobre rendimiento cognitivo (14), e inicio más tardío (posterior a los 5 años) a mejor rendimiento neuropsicológico (33). La actividad ictal e interictal durante el período de maduración del córtex puede interferir en el normal desarrollo cerebral y producir cambios en la configuración del patrón de conexiones de la corteza cerebral (52), lo cual propicia una plasticidad cerebral mal adaptativa (17).

Se enuncia una diferenciación en la influencia del tipo de crisis sobre el deterioro. Las crisis generalizadas se relacionan con mayor deterioro que las parciales (2, 4, 15) y la presencia de un solo tipo de crisis conlleva a menor deterioro (32).

El deterioro cognitivo correlaciona positivamente con la frecuencia de las crisis (2, 32), teniendo repercusiones en el desarrollo y mantenimiento de las funciones cognitivas, la llamada “carga de crisis” acumulada a lo largo de la vida (45). Esta “carga”, está en función de los tipos de crisis, frecuencia y duración de la epilepsia (8). Se reconoce además, el efecto que sobre la cognición tiene la frecuencia de las descargas subclínicas interictales, denominado daño cognitivo transitorio, relacionado con el área en la que éstas tienen su origen (1).

La variable años de duración se refiere al número de años en que se mantiene la enfermedad, de los cuales se descuentan los períodos de control de las crisis (15). A más tiempo de evolución de la epilepsia mayor deterioro cognitivo (14, 17). La prolongada permanencia de crisis afecta cognitivamente las áreas donde se encuentra la zona epileptogénica, y la generalización de las crisis al hemisferio contralateral, produce daños en áreas contralaterales (32).

La influencia de la terapia farmacológica mencionada como otro factor incluye diferentes variables: el fármaco en sí, la dosis utilizada, el tiempo de escalada de dosis, la combinación de fármacos (6, 33) y las concentraciones plasmáticas (6, 20). Se plantea que la medicación puede asociarse a fallos en la atención (16, 35) y en la memoria (6, 35), a cuadros de inhibición sobre la actividad nerviosa superior (somnolencia), a comportamiento apráxico y a déficit en la motricidad fina (35).

La neuropsicología, al estudiar pacientes con diagnóstico de epilepsia, evalúa la influencia de estos factores en el deterioro cognitivo y contribuye, con la descripción del estado cognitivo de forma evolutiva (32), a la toma de decisión para cambios de estrategia farmacológica o para la selección de la opción quirúrgica.

La eficacia del tratamiento quirúrgico radica en determinar adecuadamente la zona epileptogénica. Las unidades de epilepsia deben contar con un equipo multidisciplinario de profesionales que brinden información, cada uno desde su especialidad. De la concordancia de esta información, aportada entre otros por los estudios de neuropsicología y neurofisiología, depende el éxito de la cirugía (4), entendiéndose mayor control de crisis y menor afectación cognitiva.

La neuropsicología, en la etapa pre-quirúrgica, informa del estado general cognitivo del paciente (30), delimita alteraciones neuropsicológicas que permitan determinar, compromiso difuso-localizado, lateralización del foco o lesión, localización del déficit y lateralidad de lenguaje (40). A partir de esta información elabora un pronóstico de posibles cambios neuropsicológicos asociados a la intervención quirúrgica (3), siendo evaluados y tomados en consideración posibles riesgos cognitivos para decidir si el paciente es buen candidato para la neurocirugía (17). En la etapa posterior a la cirugía evalúa el impacto y morbilidad neuropsicológica sobre la cognición (31) asociada a la intervención quirúrgica y a la resección de determinadas zonas.

En la literatura se enuncian aspectos a tener en cuenta al emitir conclusiones diagnósticas sobre los resultados de la evaluación pre-quirúrgica, las cuales pueden influir sobre la emisión del pronóstico. Entre ellos destacan posibles modificaciones en patrones de asimetría interhemisférica por daño cerebral temprano (4).

Dentro del grupo de las epilepsias focales refractarias a tratamiento farmacológico, las más frecuentes resultan las del lóbulo temporal mesial, considerada la de mayor refractariedad, seguida de las ubicadas en regiones frontales (42).

En la epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente se reporta afectación en la memoria declarativa (42). Las estructuras del sistema hipocámpico están funcionalmente asociadas a la memoria semántica (28, 40) y a la memoria episódica (17, 42), de estos dos subsistemas predomina el compromiso en la memoria episódica (24), con una lateralización funcional en cuanto a la modalidad verbal y

visuoespacial. Cuando el foco epileptógeno se localiza en el hemisferio izquierdo son referidos déficits en la memoria episódica, modalidad verbal, y cuando la localización es en hemisferio derecho la afectación del proceso es para material no-verbal (14, 42, 46). No obstante, para algunas variables de memoria episódica, la existencia de una lesión temporal unilateral, independientemente de su lateralización, es suficiente para que se produzcan alteraciones en ambos tipos de modalidades mnésicas (39).

En la memoria semántica, la denominación se afecta en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal izquierdo, siendo menos frecuente el compromiso en pacientes con localización derecha del foco (40). Las referencias en cuanto a la fluidez son menos consistentes, puede no reportarse afectada (40) o aparecer deteriorada en pacientes con foco derecho e izquierdo.

En cuanto al compromiso cognitivo asociado a la neurocirugía, se reporta deterioro en tareas de memoria episódica (27, 39, 46) y semántica (27, 39), afectación del aprendizaje, almacenamiento y recuperación de la información a largo plazo, con mayor sensibilidad ante el efecto de la interferencia retroactiva (25), además de alteraciones en el lenguaje (46).

Existe consenso en señalar la presencia de deterioro post-cirugía de las funciones ipsilaterales y mejorías en el rendimiento de funciones contralaterales (19, 32, 40), al sitio de resección. El primer resultado está asociado a la resección de estructuras que resultan funcionales desde el punto de vista neuropsicológico, y el segundo se explica por el éxito de la intervención, reflejado en disminución o eliminación de las crisis, las cuales dejan de propagarse al hemisferio contralateral. El área sin daño estructural, al quedar libre del efecto nocivo de las crisis, favorece un mejor rendimiento de los procesos cognitivos con los que se asocia. Otro aspecto que justifica estos resultados es la reducción de las dosis o de los fármacos antiepilépticos que se introduce en respuesta a la evolución del paciente (40).

Para determinar el pronóstico de un paciente que será sometido a neurocirugía el neuropsicólogo utiliza dos modelos teóricos: el de reserva funcional y el de adaptación funcional del hipocampo (3). El primero se apoya en resultados obtenidos durante el proceder de anestesia intracarotideo y valora la reserva funcional del hipocampo contralateral y el segundo basa el pronóstico en el estudio

neuropsicológico pre-quirúrgico evaluando la capacidad funcional del hipocampo ipsilateral a la cirugía (3).

En las epilepsias frontales los estudios no refieren un patrón de deterioro tan consistente (14). El lóbulo frontal es funcionalmente heterogéneo en relación a las diferentes subdivisiones, el alto grado de complejidad y variabilidad de las diferentes secciones refleja la diversidad de los déficits neuropsicológicos. Los estudios reportan déficits en la coordinación y planeamiento motor, reducción del volumen de atención y dificultades en la respuesta inhibitorias de tareas cognitivas complejas, señalándose como un déficit neuropsicológico destacable el deterioro en la destreza motora (42)

La ubicación de la zona epileptógena en las regiones prefrontales se asocia a alteración de funciones ejecutivas, dificultades en la planificación, flexibilidad, inicio e inhibición de la conducta y alteraciones en la memoria de trabajo. Cuando el origen de las crisis se localiza en área motora suplementaria las dificultades se manifiestan en el aprendizaje y realización de secuencias motoras simples y en tareas de memoria procedural (31). Por otra parte se plantea que en este tipo de epilepsia la capacidad de lateralización funcional es mínima, siendo compleja la determinación de la existencia de asimetrías hemisféricas (31).

En relación a las consecuencias neuropsicológicas asociadas a la cirugía se destacan resultados positivos, reflejado en mejorías en la memoria a corto plazo en pacientes libres de crisis, aunque aparecen reportes de morbilidad neuropsicológica en aspectos de la cognición en dependencia del área intervenida (42). Se asocia reducción de la fluencia verbal en lesiones relativamente pequeñas dorsolaterales de hemisferio dominante y deterioro de la fluencia de diseños en lesiones frontales de hemisferio no dominante (44).

El lograr una mejor calidad de vida en los pacientes es objetivo prioritario de los especialistas en el tratamiento de pacientes con diagnóstico de epilepsia. Este concepto incluye control de las crisis y conservación del componente cognitivo (5). En garantizar este último aspecto la neuropsicología juega un papel evaluador y orientador, por lo que se convierte en un desafío para esta especialidad profundizar en los perfiles cognitivos que se asocian a esta patología, con el objetivo de prever la aparición de estos y orientar en vías de su minimización.

ELECTROFISIOLOGÍA Y COGNICIÓN EN LA EPILEPSIA

La evaluación del déficit cognitivo que acompaña a la epilepsia demostrada con el empleo de los clásicos *tests* neuropsicológicos incluye eventualmente el uso de técnicas que permiten registrar la actividad eléctrica cerebral relacionada con las diferentes esferas de la cognición (16, 53) puede ser el resultado del compromiso funcional primario de las áreas cerebrales donde se encuentra la zona de inicio ictal, su interferencia con otros circuitos neuronales vinculados al procesamiento cognitivo, o secundario a la medicación antiepiléptica durante largos periodos de tiempo (11, 37), entre otros factores.

Las técnicas electrofisiológicas utilizadas por excelencia con este propósito son los potenciales relacionados a eventos (PRE) cognitivos, oscilaciones del voltaje temporalmente asociadas a la activación sincrónica de grandes poblaciones neuronales en fase con eventos particulares (18), y compuestos por una serie de deflexiones o componentes que reflejan etapas del procesamiento de la información en el cerebro, pudiendo ser registradas mediante electrodos colocados en la superficie del cuero cabelludo o mediante electrodos de registro profundo.

Estas técnicas proporcionan una poderosa herramienta con una alta resolución temporal, en el orden de los milisegundos, incluso permiten demostrar alteraciones cognitivas subclínicas muy sutiles (41) y son ampliamente utilizadas para el estudio de las bases neurológicas de procesos tales como atención, memoria y lenguaje. Entre ellas se encuentran aquellas que evalúan los componentes P300, N400, N450, MMN (siglas del inglés *mismatch negativity*), etc., y su denominación expresa generalmente la polaridad y latencia de aparición de dichos componentes.

Especialmente con fines de investigación han sido diseñados innumerables paradigmas y esquemas de estimulación para la obtención de estas respuestas (23).

P300 y Epilepsias

Uno de los PRE más utilizados lo constituye la onda P300 (Figura 1), compuesta por varios subcomponentes y frecuentemente registrado con el empleo del paradigma clásico conocido como “*oddball*”, donde el sujeto es instruido para detectar un estímulo *target* infrecuente presentado entre una secuencia de estímulos frecuentes, y que permite evaluar además el tiempo de reacción durante la ejecución de la tarea (23).

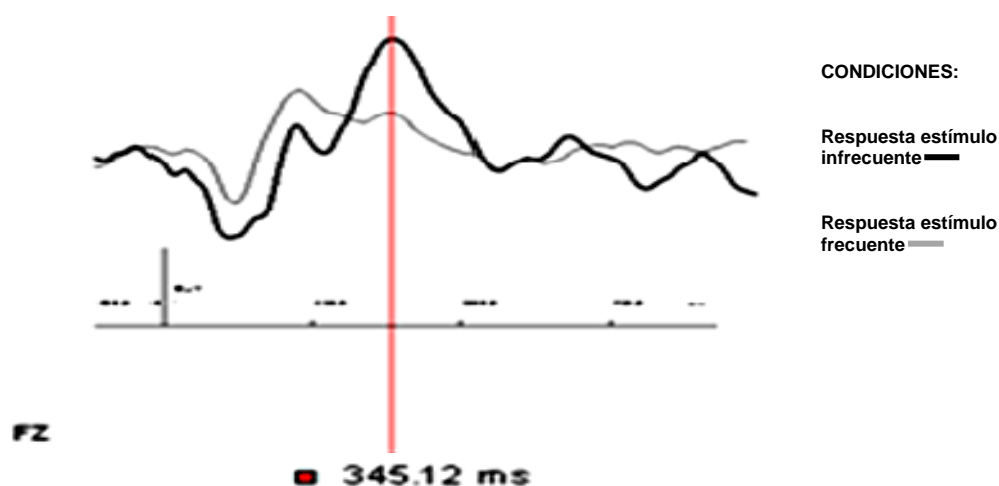


Figura 1. Componente P300 registrado con el empleo del paradigma clásico “oddball” con estimulación auditiva. Electrodo de registro: Fz (Fuente: Laboratorio de Potenciales Evocados, CIREN)

En los pacientes con epilepsia generalizada idiopática se ha descrito la existencia de alteraciones en la evaluación neuropsicológica (escala de inteligencia de Wechsler y el *test* volumen de retención de dígitos) que acompañan a cambios en la latencia y amplitud del componente P300, lo que confirma la existencia de un declive de las funciones cognitivas en estos pacientes, especialmente de la memoria, atención, concentración y velocidad del procesamiento mental corroborado por el estudio del componente P300 (50).

Otros autores han especulado que la prolongación de latencia de este componente en niños con epilepsia generalizada idiopática podría estar en relación con la participación de la formación reticular mesencefálica y el tálamo en su génesis (49). Los pacientes con crisis de ausencias tienen un desempeño más pobre en las pruebas conductuales de atención sostenida que aquellos que presentan crisis parciales complejas, lo cual ha sido corroborado con la evaluación electrofisiológica. Se ha observado una significativa reducción en la amplitud de la P300 en una tarea visual de atención sostenida en pacientes con crisis de ausencia y pacientes con crisis parciales complejas al comparar con sujetos sanos; sin embargo en una tarea similar con estimulación auditiva la amplitud de la P300 solo mostró afectación en los pacientes con crisis de ausencia, lo que apoya los hallazgos conductuales que demuestran el deterioro de estos pacientes para movilizar y sostener la atención, y que pudiera estar en relación con una mayor vulnerabilidad del sistema atencional

auditivo, o con la disfunción conocida a nivel de tallo encefálico en los pacientes con crisis de ausencias (13).

La relación del desempeño cognitivo con la severidad de la epilepsia ha sido también demostrada en niños con epilepsia rolándica benigna y epilepsia generalizada idiopática bien controlada que no tuvieron diferencias conductuales en la ejecución de una tarea con respecto a niños sanos (número de errores y tiempo de reacción). Sin embargo, los PRE mostraron amplitudes significativamente superiores sobre las regiones frontal y central de los pacientes en una ventana temporal entre 250 y 425 milisegundos post-estímulo. Estos resultados de conjunto sugieren un patrón de activación cortical diferente en estos pacientes, y un mayor esfuerzo para lograr el mismo nivel de ejecución que los sujetos sanos (36).

La atención es una de las funciones cognitivas frecuentemente afectada en los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ELT), y se ha demostrado también la existencia de alteraciones en la latencia y amplitud de la onda P300 en estos pacientes.

Realizando un estudio de las estructuras generadoras de este componente a partir de registros de alta densidad (128 canales), Bocquillon y colaboradores, encontraron una reducción del componente P300 en las fuentes generadoras temporales (particularmente mesiotemporales) y en menor medida en las estructuras frontales de los pacientes con ELT estudiados, lo que pudiera estar relacionado con la disfunción local provocada por la zona de inicio ictal, o por la interferencia de esta con los circuitos atencionales (6).

Se ha descrito además la alteración selectiva del componente P300 según la modalidad sensorial explorada, y el nivel de atención utilizado para su obtención en los pacientes con ELT (51), así como su reducción transitoria luego de la lobectomía temporal (26). No se ha encontrado relación entre la latencia de este componente y la duración de la enfermedad, o la edad de inicio de las crisis, pero sí con el tipo de crisis y su frecuencia (10). La existencia de P300 normal reportada en un estudio de pacientes con ELT de reciente inicio y no tratados hace sospechar la existencia de un compromiso atencional asociado al uso de la medicación (9), lo cual ha sido demostrado evaluando el efecto que sobre la atención y los componentes N270 y P300 tienen el valproato, la carbamazepina y el topiramato (47, 48).

Sin embargo, el déficit cognitivo más significativo en la ELT es la afectación de la memoria declarativa anteriormente reseñada en este capítulo. Algunos reportes en la literatura confirman la utilidad de la P300 para su evaluación, ya que durante la ejecución del paradigma clásico anteriormente descrito, el sujeto debe mantener un trazo de memoria a corto plazo del estímulo previo para su comparación con los estímulos sucesivos (21).

Utilizando electrodos de registros profundos, colocados para el monitoreo de las crisis, se ha estudiado la participación de estructuras del lóbulo temporal medial en la génesis de la P300, encontrando la activación en paralelo de dos generadores: uno en el *subiculum* anterior y otro en el hipocampo posterior, estructuras esenciales del sistema de memoria del lóbulo temporal medial (29).

N400

El componente N400 básicamente se registra al presentar una palabra escrita al final de una oración que resulta semánticamente incongruente con el contenido de la misma (18), aunque pueden utilizarse otros paradigmas para su obtención. Tradicionalmente utilizado para caracterizar los procesos involucrados en la memorización de material verbal (38), este componente ha sido registrado en el lóbulo temporal mesial anterior correlacionándolo con la memoria verbal, y está asociado con la detección novedosa. La reducción en amplitud del componente N400 descrita en pacientes con esclerosis hipocampal confirma el compromiso de estas funciones (22). Incluso, esta reducción en amplitud del componente N400 ha sido demostrada en los registros de hipocampo en el lado en que se originan las crisis durante la exploración con palabras pero no con imágenes, lo que sugiere su especial relación con la memoria verbal (12).

Otros autores han reportado también la reducción en amplitud del componente N400 en pacientes con ELT utilizando otros paradigmas de exploración y electrodos de registro superficiales, sugiriendo su utilidad para demostrar trastornos en el procesamiento semántico en estos pacientes (34).

MMN

Cuando existe una disparidad entre las características físicas del estímulo infrecuente y el trazo neuronal de memoria sensorial producido por los estímulos frecuentes se genera el potencial de disparidad o MMN que ha sido estudiado tanto

en pacientes con crisis generalizadas como en pacientes con crisis parciales complejas con generalización secundaria. La duración prolongada del MMN encontrada en estos pacientes podría estar relacionada con dificultades para la discriminación novedosa, lo que a su vez limitaría las capacidades de concentración y memoria ya descritas en estos pacientes (20).

En resumen, los estudios electrofisiológicos basados en el registro superficial o profundo de los PRE proporcionarán cada vez más evidencias del compromiso cognitivo en los pacientes con epilepsia, en estrecha correspondencia con los resultados de la evaluación neuropsicológica.

REFERENCIAS

1. Aarts JH, Binnie CD, Smit AM, Wilkins AJ. Selective cognitive impairment during focal and generalized epileptiform EEG activity. *Brain* 1984; 107: 293-308.
2. Aldenkamp AP. Cognitive impairment in epilepsy: state of affaire and clinical relevance. *Seizure* 2006; 219-20.
3. Allegri RF, Drake M, Thomson A. Heterogeneidad neuropsicológica en los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mesial. *Rev Neurol* 1999; 29 (12): 1160-1163.
4. Arnedo M, Espinosa M, Ruiz R, Sánchez JC. Intervención neuropsicológica en la clínica de la epilepsia. *Rev Neurol* 2006; 43 (Supl1): S83-S88.
5. Barr W. Epilepsy and Neuropsychology: past, present and future. *Neuropsychol Rev* 2007; 17: 381-383.
6. Bocquillon,P., Dujardin,K., Betrouni,N., Phalempin,V., Houdayer,E., Bourriez,J.L., Derambure,P., Szurhaj,W. Attention impairment in temporal lobe epilepsy: a neurophysiological approach via analysis of the P300 wave. *Hum Brain Mapp* 2009; 30: 2267-2277
7. Campos J. Neuropsicología y epilepsia: ¿qué factores están implicados? *Rev Neurol* 2006; 43 (Supl 1): S59-S70.
8. Carreño M, Donaire A, Sánchez R. Cognitive disorders associated with epilepsy: diagnosis and treatment. *Neurologist* 2008; 14 (Suppl 1): S26- S34.
9. Chayasirisobhon,W.V., Chayasirisobhon,S., Tin,S.N., Leu,N., Tehrani,K., McGuckin,J.S. Scalp-recorded auditory P300 event-related potentials in new-onset untreated temporal lobe epilepsy. *Clin EEG Neurosci* 2007; 38: 168-171.
10. Chen,R.C., Tsai,S.Y., Chang,Y.C., Liou,H.H. Seizure frequency affects event-related potentials (P300) in epilepsy. *J Clin Neurosci* , 2001;8: 442-446.
11. Chen,Y.J., Kang,W.M., So,W.C. Comparison of antiepileptic drugs on cognitive function in newly diagnosed epileptic children: a psychometric and neurophysiological study. *Epilepsia* 1996; 37: 81-86.
12. Dietl,T., Kurthen,M., Kirch,D., Staedtgen,M., Schaller,C., Elger,C.E., Grunwald,T. Limbic event-related potentials to words and pictures in the presurgical evaluation of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2008; 78: 207-215.
13. Duncan,C.C., Mirsky,A.F., Lovelace,C.T., Theodore,W.H. Assessment of the attention impairment in absence epilepsy: comparison of visual and auditory P300. *Int J Psychophysiol* 2009; 73: 118-122.
14. Elger CE, Helmstaedter C, Kurthen M. Chronic epilepsy and cognition. *The Lancet Neurology* 2004; 3: 663-672.
15. Farwell JR, Dodrill CB, Batzel LW. Neuropsychological abilities of children with epilepsy. *Epilepsia* 1985; 26: 395-400.
16. Fell,J., Dietl,T., Grunwald,T., Kurthen,M., Klaver,P., Trautner,P., Schaller,C., Elger,C.E., Fernandez,G. Neural bases of cognitive ERPs: more than phase reset. *J Cogn Neurosci* 2004;16: 1595-1604.
17. Fournier C, Pérez Ma, García M, García JJ, Villarejo F. Evaluación neuropsicológica pre-quirúrgica en epilepsias focales pediátricas. *Rev Neurol* 2010; SO (Supl 3):S49-S57.

18. Friederici, A.D. Event-related brain potentials and aphasia. R.S. Berndt (Ed.) Handbook of Neuropsychology, 2nd Ed. Elsevier Science, Amsterdam, 2001; pp. 353-373.
19. García ME, Morales L, Salazar S, Bender JE, García I, Sarduy I. Neuropsicología en pacientes con epilepsia temporal sometidos a cirugía. *Rev Mex Neuroci* 2004; 5 (1): 38-41.
20. Gene-Cos, N., Pottinger, R., Barrett, G., Trimble, M.R., Ring, H.A., A comparative study of mismatch negativity (MMN) in epilepsy and non-epileptic seizures. *Epileptic Disord* 2005; 7: 363-372.
21. Grippo, A., Pelosi, L., Mehta, V., Blumhardt, L.D. Working memory in temporal lobe epilepsy: an event-related potential study. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1996; 99: 200-213.
22. Grunwald, T., Kurthen, M. Novelty detection and encoding for declarative memory within the human hippocampus. *Clin EEG Neurosci* 2006; 37: 309-314.
23. Heinze H.J, Münte T.F, Kutas M, Butler S.R, Näätänen R, Nuwer M.R, Goodin D.S. Cognitive event-related potentials. G. Deuschl and A Eisen (Ed.) Recommendations for the Practice of Clinical Neurophysiology: Guidelines of the International Federation of Clinical Physiology (EEG Suppl. 52). Elsevier, Amsterdam, 1999; pp. 91-95.
24. Helmstaedter C, Reuber M, Elger CC. Interaction of cognitive aging and memory deficits relate to epilepsy surgery. *Ann Neurol* 2002; 52: 89-94.
25. Hermann BP, Wyler AR, Somes G, Dohan FC Jr., Berry AD III, Clement L. Declarative memory following anterior temporal lobectomy in humans. *Behav Neurosci* 1994; 108: 3-10.
26. Hirayasu, Y., Ohta, H., Fukao, K., Ogura, C., Mukawa, J. Transient P300 abnormality of event-related potentials following unilateral temporal lobectomy. *Psychiatry Clin Neurosci* 1995; 49: 223-226.
27. Jones-Gotman M, Smith ML, Risse GL, Westerveld M, Swanson SJ, Giovagnoli AR, Lee T, Madre-Joaquim MJ, Piazzini A. The contribution of neuropsychology to diagnostic assessment in epilepsy. *Epilepsy Behav* 2010, doi: 10.1016/j.yebeh.2010.02.019.
28. Koylu B, Walter G, Ischebeck A, Ortler M, Benke T. Functional imaging of semantic memory predicts postoperative episodic memory functions in chronic temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 2008; 1223: 73-81
29. Ludowig, E., Bien, C.G., Elger, C.E., Rosburg, T., 2010. Two P300 generators in the hippocampal formation. *Hippocampus* 2010; 20: 186-195.
30. Maestú F, Martín P, García de Sola RG, Obregón M, Gómez E, Fernández A, Sánchez A, Paúl N, Ortiz T. Neuropsicología de la epilepsia parcial temporal: comparación entre pacientes farmacorresistentes y pacientes controlados farmacológicamente. *Rev Neurol* 2000; 31 (9): 817-821.
31. Maestú F, Martín P, Gil-Nagel A, Franch O, Sola RG. Evaluación en la cirugía de la epilepsia. *Rev Neurol* 2000; 30 (5): 477-482.
32. Maestú F, Martín P, Sola R.G, Ortiz T. Neuropsicología y deterioro cognitivo en la epilepsia. *Rev Neurol* 1999; 28 (8): 793-798.
33. Mauri JA, Pascual LF, Tejero C, Iñiguez C, Escalza I, Morales F. Alteraciones neuropsicológicas en epilepsia. *Rev Neurol* 2001; 32 (1): 77-82.
34. Miyamoto, T., Katayama, J.I., Kohsaka, M., Koyama, T. Disturbance of semantic processing in temporal lobe epilepsy demonstrated with scalp ERPs. *Seizure* 2000; 9: 572-579.
35. Mulas F, Hernández S., Morant A. Alteraciones neuropsicológicas en los niños epilépticos. *Rev Neurol Clin* 2001; 2 (1): 29-41.
36. Myatchin, I., Mennes, M., Wouters, H., Stiers, P., Lagae, L., 2009. Working memory in children with epilepsy: an event-related potentials study. *Epilepsy Res* 2009; 86: 183-190.
37. Olichney, J.M., Hillert, D.G., 2004. Clinical applications of cognitive event-related potentials in Alzheimer's disease. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2004; 15: 205-233.
38. Olivares-Carreno, E.I., Iglesias-Dorado, J. Long-latency evoked potentials and mnemonic processing of faces and words. *Rev Neurol* 2008; 47: 624-630.
39. Orozco C, Verdejo A, Cuberos G, Pastor E, Sánchez JC, Altuzarra A, Castañeda M, Galdón A, Pérez M. Cambios en la memoria episódica y semántica asociados a la lobulectomía temporal. *Rev Neurol* 2002; 35 (8): 720-726.
40. Orozco C, Verdejo A, Sánchez JC, Altuzarra A, Pérez M. Neuropsicología clínica en la cirugía de la epilepsia del lóbulo temporal. *Rev Neurol* 2002; 35 (12): 1116-1135.
41. Ozmenek, O.A., Nazliel, B., Leventoglu, A., Bilir, E. The role of event related potentials in evaluation of subclinical cognitive dysfunction in epileptic patients. *Acta Neurol Belg* 2008; 108: 58-63.
42. Patrikelis P, Angelakis E, Gatzonis S. Neurocognitive and behavioral functioning in frontal lobe epilepsy: A review. *Epilepsy and Behavior* 2009; 14: 19-26.

43. Peña J. Prólogo a la edición española. En Ellis AW, Young AW, eds. *Neuropsicología Cognitiva Humana*. Masson: Barcelona; 1992.
44. Risse GL. Cognitive outcomes in patients with frontal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2006; 47: 87-9
45. Sánchez R. Variabilidad de la evolución cognitiva en los distintos tipos de epilepsia del niño. *Rev Neurol* 2010; 50 (Supl 3): S31- S36.
46. Sanjuán A, Villanueva VE, Ávila C. Evaluación pre-quirúrgica del lenguaje y la memoria mediante técnicas de resonancia magnética funcional en pacientes con epilepsia farmacorresistente. *Rev Neurol* 2008; 46 (Supl 1): S 25-S28.
47. Sun,W., Wang,W., Wu,X., Wang,Y. Antiepileptic drugs and the significance of event-related potentials. *J Clin Neurophysiol* 2007; 24: 271-276.
48. Sun,W., Wang,Y., Wang,W., Wu,X. Attention changes in epilepsy patients following 3-month topiramate or valproate treatment revealed by event-related potential. *Int J Psychophysiol* 2008; 68: 235-241.
49. Sunaga,Y., Hikima,A., Otsuka,T., Nagashima,K., Kuroume,T. P300 event-related potentials in epileptic children. *Clin Electroencephalogr* 1994; 25: 13-17.
50. Tandon,O.P., Duhan,P. Event related evoked potential responses in epileptic patients. *Indian J Physiol Pharmacol* 2000 ; 44 : 461-466.
51. Trinka,E., Unterrainer,J., Luef,G., Ladurner,G. Multimodal P3 under different attentional states in mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurol* 2001; 8: 261-266.
52. Vingerhoets G. Cognitive effects of seizures. *Seizure* 2006; 15: 221-6.
53. Zgorzalewicz,M., Nowak,R. P300 event-related potential in epileptic children and adolescents. *Neurol Neurochir Pol* 2000; 34 Suppl 1:109-118.

ADMINISTRACIÓN DE MPTP POR VÍA INTRANASAL COMO MODELO EFECTIVO PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

¹Rojas-Mayorquín AE, ²Ortuño-Sahagún D.

¹Instituto de Geriatría, Institutos Nacionales de Salud, México.

²Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural, Instituto de Neurobiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

INTRODUCCIÓN

El uso de modelos animales para el estudio de patologías humanas, como la enfermedad de Parkinson (EP), ha demostrado ser de gran utilidad. Los modelos animales de enfermedades neurológicas han reproducido con precisión muchos aspectos de diversas enfermedades humanas y permiten su estudio detallado. Estos modelos han sido la fuente de una gran cantidad de información y han revelado la importancia de determinados mecanismos moleculares y genéticos en el desarrollo de la enfermedad.

Así mismo, los modelos animales se han utilizado para el descubrimiento y el análisis de los posibles tratamientos terapéuticos. Aunque la mayoría de las enfermedades neurológicas aún no han sido completamente esclarecidas y no hay un tratamiento definitivo, el recurrir a modelos animales permite avanzar en la dirección correcta (Shah y col., 2010).

LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La EP es una patología neurodegenerativa, progresiva y debilitante que se caracteriza, en sus etapas clínicas avanzadas, por un mal funcionamiento del sistema motor que ocasiona rigidez en las extremidades, un síntoma conocido como “rueda dentada”, bradikinesias o lentitud de movimientos, arrastre de los pies, marcha

anormal y pérdida de la coordinación, así como un temblor de reposo denominado “pill-rolling”. Esta sintomatología se acompaña también de una expresión facial que es conocida como “rostro de máscara” (Figura 1).

La EP fue descrita por primera vez en 1817 por el Dr. James Parkinson en la monografía titulada “*An essay on the shaking palsy*” (Parkinson, 1817). La EP afecta del 1 al 2 % de la población mayor de 50 años de edad y la expectativa de vida después de realizado el diagnóstico es de 15 años aproximadamente.



Figura 1. Postura y facies propias de un paciente con EP. Dicha enfermedad se caracteriza por alteración de la postura, rigidez de las extremidades o lentitud de movimientos (bradikinesia) y facies en “rostro de máscara”, (Tomado del “Manual of Diseases of the Nervous System” de Sir William Richard Gowers, 1886).

El curso de la enfermedad puede dividirse en una etapa pre-sintomática y una etapa sintomática y el proceso patológico progresa durante varios años, a través de los cuales pueden identificarse seis etapas neuropatológicas (Figura 2), cada una de ellas se distingue por la formación y desarrollo continuos de los característicos cuerpos de inclusión, que se presentan en la forma de husos o filamentos en las ramificaciones de las neuronas con procesos celulares, conocidos como neuritas de Lewy (NL); y como una agregación granular y esférica en el soma de las células nerviosas, conocida como cuerpos pálidos o cuerpos de Lewy (CL) (Figura 3). Todas las neuronas afectadas eventualmente desarrollan NL y CL, a pesar de la presencia de estos cuerpos de inclusión algunas neuronas sobreviven por mucho tiempo, sin embargo las células que contienen CL/NL probablemente dejen de funcionar mucho tiempo antes de morir (Braak y col., 2004).

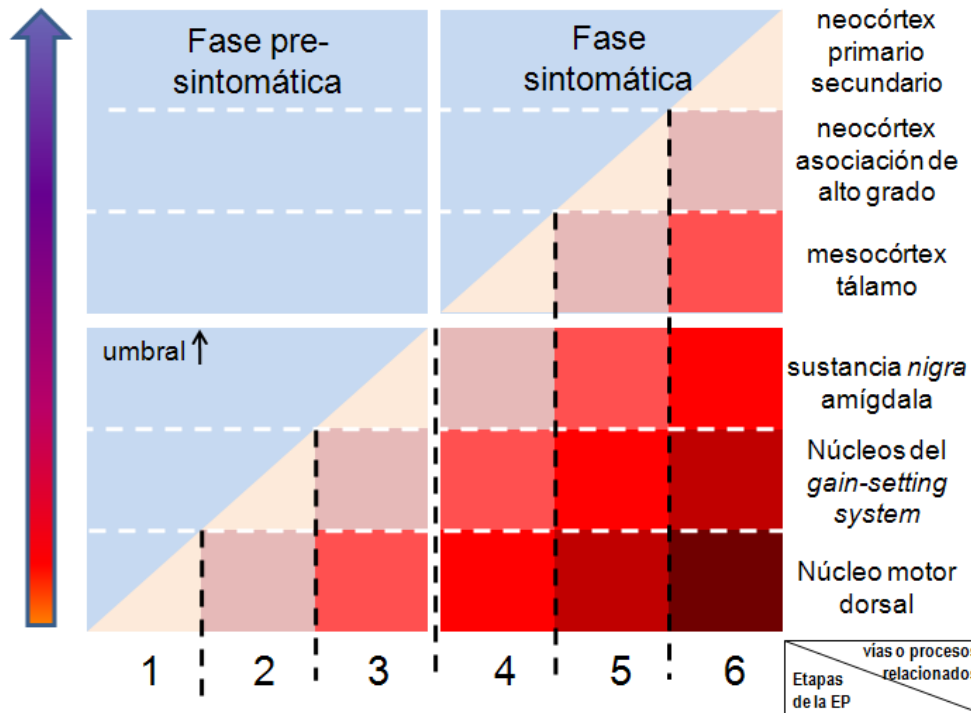
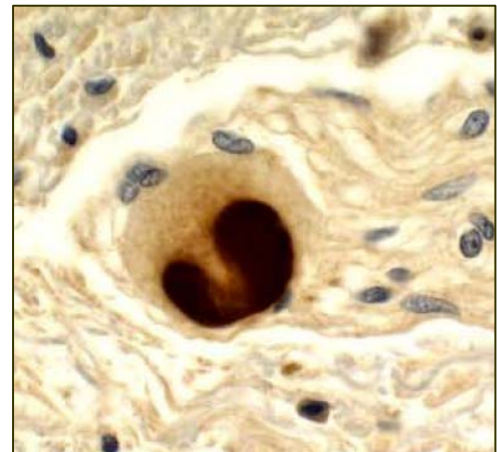


Figura 2. Fases pre-sintomática y sintomática de la EP. La fase pre-sintomática está caracterizada por la aparición de los cuerpos de Lewy en el cerebro de pacientes asintomáticos. En la fase sintomática, el umbral neuropatológico individual se eleva (flecha pequeña en color negro). La pendiente se aumenta y la intensidad de las áreas coloreadas bajo la diagonal indican una elevación de la severidad de la patología en las regiones del cerebro indicadas a la derecha (Modificado de Braak y col., 2004).

Figura 3. Cuerpo de Lewy maduro (Tomado de Braak y col., 2004). Los cuerpos de Lewy son agregados intraneuronales anormales de proteínas, su componente principal es la alfa-sinucleína, sin embargo se han identificado otras proteínas como ubiquitina, proteína neurofilamentosa o la alfa B cristalina. Aparecen como masas esféricas que desplazan al resto de componentes celulares.



La característica anatómica identificable en los tejidos de pacientes con EP es la disminución en el número de neuronas que contienen neuromelanina, localizadas en la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) en el cerebro medio. Estas neuronas dopaminérgicas proyectan sus axones tanto al estriado como a otras regiones subcorticales (Figura 4). Los primeros síntomas clínicos se manifiestan cuando aproximadamente el 60% de las neuronas de la SNpc ya han muerto (German y col.,

1989) y se ha reducido en un 70% la capacidad de respuesta a la dopamina (Ma y col., 2002).

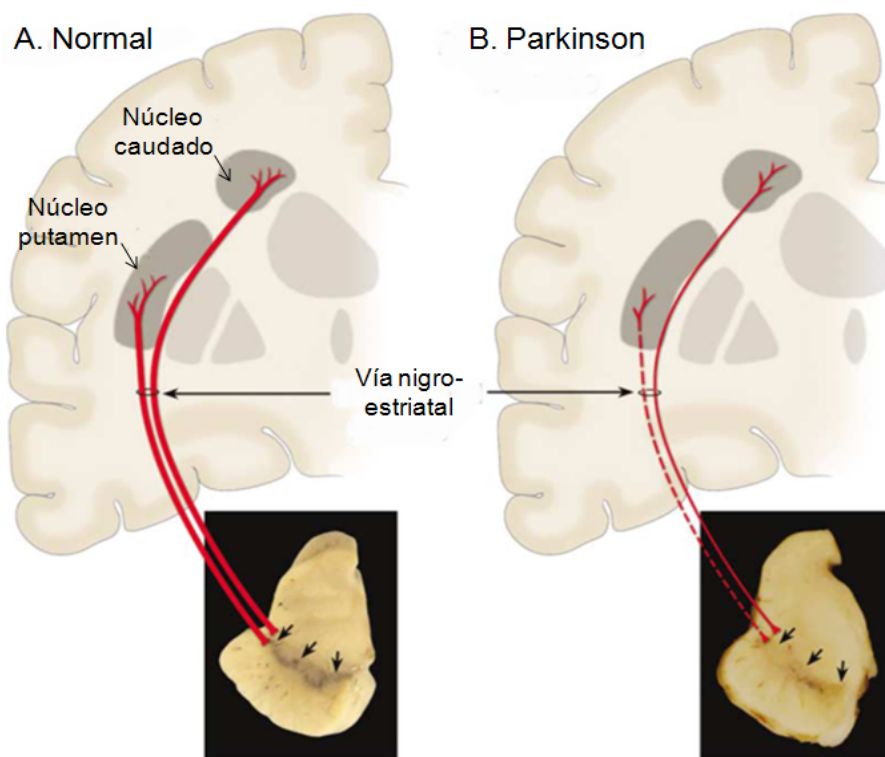


Figura 4. Neuropatología de la Enfermedad de Parkinson. (A) Representación esquemática de la vía nigro-estriatal normal (en rojo). Esta vía está compuesta por neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares se encuentran localizados en la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc, flechas negras). Estas neuronas proyectan sus axones hacia los ganglios basales y hacen sinapsis en el estriado (por ej. putamen y núcleo caudado). En la fotografía se muestra la pigmentación de la SNpc producida por la neuromelanina de las neuronas dopaminérgicas. (B) Representación esquemática de la vía nigroestriatal en la EP. En la EP la vía nigro-estriatal ha degenerado (en rojo). Existe una evidente pérdida de neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia ganglios basales. La fotografía muestra la despigmentación de la SNpc producto de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (Modificado de Dauer y Przedborski, 2003).

La disminución de la capacidad para identificar olores se presenta en la mayoría de los pacientes con EP idiopática. Esta alteración es bilateral, estable a través del tiempo, se presenta en etapas muy tempranas del desarrollo de la enfermedad y lo hace de forma independiente a la administración de drogas antiparkinsonianas, además de que no se ha relacionado con los diferentes estadios de la enfermedad, ni con la intensidad de las disfunciones motoras y cognitivas. A pesar de la importante disminución en la capacidad olfativa, la mayoría de los pacientes con EP no se percata de ella hasta realizar una prueba olfatoria (Doty y col., 1988, 1992a, 1992b; Quinn y col., 1987; Ward y col., 1983).

Aún no se ha establecido con precisión el porcentaje de pacientes de EP que la como resultado exclusivo de factores ambientales, con una causa estrictamente genética o como una combinación de ambas condiciones (Di Monte, 2003; Steece-Collier y col., 2002). La mayoría de los estudios epidemiológicos concluyen que menos del 10% de la EP tiene una estricta etiología familiar (Payami y Zareparsari, 1998). Esto incluye un pequeño número de pacientes con parkinsonismo familiar con polimorfismos en el gen de α -synucleina (Polymeropoulos y col., 1997) así como pacientes con inicio temprano de la EP, los cuales presentan una mutación recesiva en el gen de la Parkina, identificado en el brazo largo del cromosoma 6 (6q25.2-q27; Gasser, 2001). Hacia finales de la década de los años sesenta, se había descubierto que el reemplazo de la dopamina estriatal pérdida por la EP, a través de la administración oral del precursor de la dopamina (DA), la levodopa (L-3,4-dihidroxi-fenilalanina), aliviaba la mayoría de los síntomas de la enfermedad (Tintner y Jankovic, 2002). El efecto antiparkinsoniano de la levodopa administrada por vía oral fue descubierto por Cotzias en 1967 (Cotzias y col., 1967). A pesar de que este descubrimiento, revolucionó el tratamiento contra la EP, pronto se demostró que después de varios años de tratamiento, la mayoría de los pacientes desarrollaban movimientos involuntarios, denominados “diskinesias”, los cuales son difíciles de controlar y disminuyen significativamente la calidad de vida del paciente con EP (Zappia y col., 2009).

Por lo tanto, las investigaciones más recientes están dirigidas a la prevención de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. A pesar de los avances en este campo, todos los tratamientos actuales son sintomáticos y ninguno evita o retarda la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. El principal obstáculo en el desarrollo de medicamentos neuroprotectores es el desconocimiento de los fenómenos moleculares específicos que ocasionan la neurodegeneración en la EP (Dauer y Przedborski, 2003).

Como la mayoría de los pacientes con EP no tienen una mutación genética identificable, se puede obtener información importante al observar la fisiopatología de la EP a través del estudio de los modelos animales que mimetizan la enfermedad.

LOS MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA EP

Son varios los modelos que han sido desarrollados para el estudio de los mecanismos subyacentes en el desarrollo experimental de la EP. Modelos patológicos han intentado utilizar una serie de toxinas, por ejemplo, la reserpina, los inhibidores de la tirosina hidroxilasa (TH) como la alfa-metil-p-tirosina, o una combinación de ellas, la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la rotenona y el paraquat, así como el uso de modelos transgénicos de defectos genéticos en la EP familiar y cepas mutantes de roedores (knock-out). La infección bacteriana por *Nocardia spp.* también ha sido reportada como modelo de la EP, pues ocasiona desórdenes de movimiento sensibles a la levodopa e induce apoptosis celular de células dopaminérgicas en la sustancia *nigra* (Hyland y col., 2000; Tam y col., 2002). Por otro lado, se han desarrollado modelos en donde pueden ser analizados tratamientos tanto dopaminérgicos como no dopaminérgicos (Jenner, 2008).

Uno de los primeros modelos en ser desarrollados, consiste en realizar una lesión en la vía nigro-estriatal, de donde las fibras emanan y se dirigen desde la sustancia *nigra* hacia el cuerpo estriado rostral, a través del haz medio del cerebro anterior (Faull y Mehler, 1978; Brecknell y col., 1995). Otros modelos han utilizado lesiones químicas, por ejemplo la 6-OHDA, una neurotoxina que cuando es inyectada directamente en el estriado ocasiona una degeneración retrógrada de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc (Figura 5; Schwarting y Huston, 1996; Deumens y col., 2002; Hirsch y col., 2003). El modelo de lesión en ratas con 6-OHDA también es utilizado para estudiar las complicaciones motoras producidas por distintos tratamientos (Jenner, 2008).

Otro modelo experimental, probablemente el de mayor avance en relación a los modelos experimentales de la EP, utiliza las propiedades neurotóxicas selectivas del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) para producir una degeneración nigral selectiva y parkinsonismo (Davis y col., 1979; Langston y col., 1983a, 1984a; Smeyne y Lewis, 2005). Las secuelas de la degeneración que ocurren tras la administración de MPTP en animales ha resultado ser un útil modelo de la EP debido a que induce una patología similar a la presentada en los humanos y provee del primer modelo efectivo de la EP en primates no humanos (Burns y col., 1983, 1984). Resulta interesante que el uso del MPTP podría ser uno de los pocos casos en

el cual el efecto de una neurotoxina fue descubierto primero en humanos, seguido posteriormente por el desarrollo de un modelo experimental animal (Smeyne y Lewis, 2005).

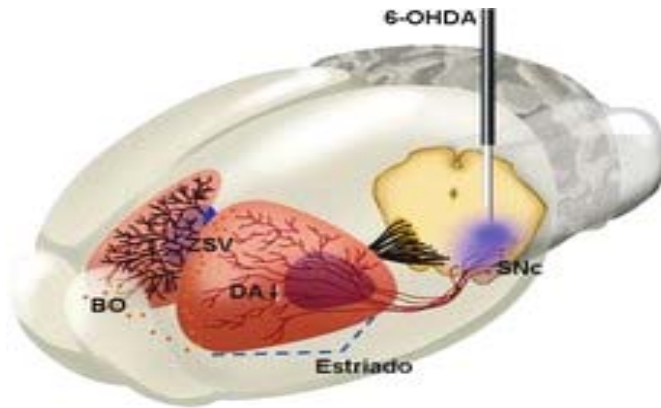


Figura 5. Representación esquemática de la administración intracerebral de 6-OHDA en un cerebro de roedor. La 6-OHDA es una neurotoxina que al inyectarse directamente en el estriado ocasiona degeneración retrógrada de las neuronas dopaminérgicas de SNpc, lo que ocasiona una disminución de la dopamina (DA) en el cuerpo estriado. Este fue uno de los primeros modelos animales en ser utilizados para el estudio de la fisiopatología de la EP.

El MPTP es una toxina xenobiótica que ocasiona la destrucción selectiva de células dopaminérgicas de la sustancia *nigra*, lo cual se asocia a un síndrome parkinsoniano tanto en el ser humano como en los primates. También se han identificado efectos similares en otros animales como gatos, perros, ovejas, peces y diversos roedores (Heikkila y col., 1984a; Gerlach y Riederer, 1996). En roedores, se ha demostrado que únicamente algunas cepas específicas de ratones son sensibles a la administración del MPTP (Heikkila y col., 1984b; Sundstrom y col., 1987; Riachi y Harik, 1988; Hamre y col., 1999; Mitra y col., 1994).

Se ha sugerido que la enfermedad de Parkinson idiopática podría estar provocada por contaminantes ambientales, con propiedades tóxicas semejantes al MPTP. La estructura del neurotóxico MPTP (Figura 6) es similar a una gran cantidad de agentes ambientales, que incluyen herbicidas, como el paraquat (Di Monte y col., 1986) y algunos insecticidas de jardín, como la rotenona, de los cuales se ha demostrado que inducen degeneración de células dopaminérgicas, sin embargo los mecanismos de acción de cada uno son diferentes (revisado en Smeyne y Lewis, 2005). El estudio de los mecanismos de cada una de estas toxinas puede conducir a la identificación de la vía común que subyace a la afectación inducida por dichas toxinas.

La hipótesis del “vector olfatorio” postula que la EP puede ser originada o catalizada por agentes que ingresan el cerebro por la vía de la mucosa olfatoria (Doty, 2008).

Recientemente, se ha demostrado en un modelo murino que la infusión intranasal de MPTP genera los síntomas progresivos de la EP, que incluyen la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Prediger y col., 2010).

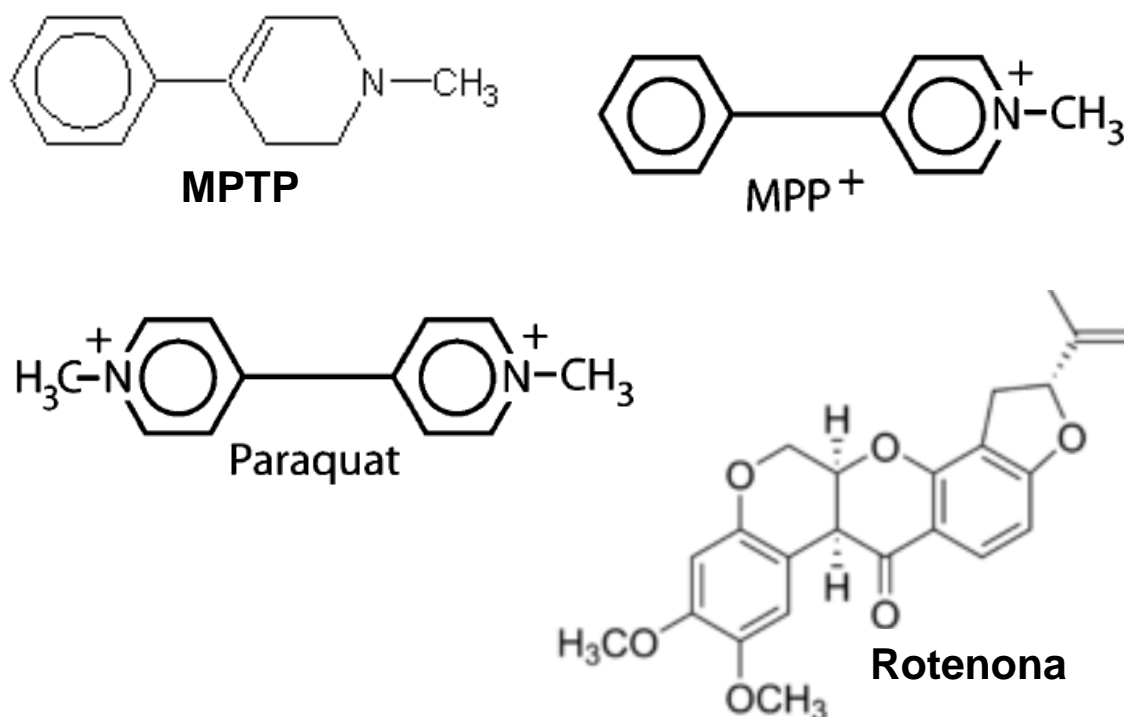


Figura 6. Esquemas comparativos de las estructuras de diferentes neurotóxicos capaces de generar la sintomatología de la EP en diferentes modelos animales.

MPTP, HISTORIA Y MECANISMOS GENERALES

El MPTP es un subproducto de la síntesis de un sustituto de la heroína. En la década de los setentas se descubrió, de manera accidental, que ocasiona un síndrome parkinsoniano irreversible en jóvenes toxicómanos (Davis y col., 1979; Langston y col., 1983a, 1983b). En 1977, en California, un hombre de 23 años que gozaba aparentemente de buena salud, fue atacado por un síndrome parkinsoniano persistente desde su aparición y hasta por 3 meses. A pesar de la toxicomanía de este paciente, la hipótesis de una intoxicación crónica por neurolépticos u otros fármacos que pueden producir un “pseudo-parkinsonismo”, espontáneamente reversible después de suspender las dosis, fue excluida. Fue la corta edad del paciente lo que obligó a los médicos y toxicólogos de la época a profundizar en las causas de este cuadro clínico (Davis y col., 1979; Langston y col., 1983b). El estudio

detallado del historial clínico del paciente reveló que éste tenía nociones de química, que había sintetizado y se había administrado un análogo de la morfina y de la heroína, el 1-metil-4-fenil-4-propionoxi-piperidina (MPPP), el cual posee una fuerte actividad analgésica pero que, sorprendentemente, no está incluido en la tabla de estupefacientes.

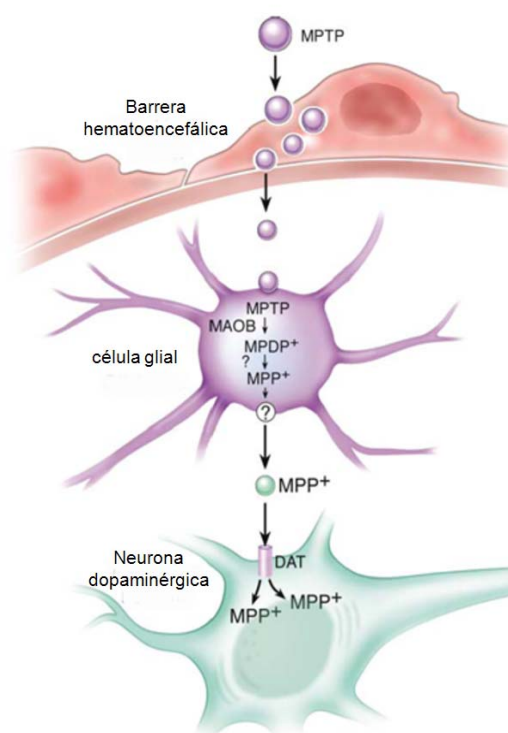
Sin embargo, la rápida aparición de ésta molécula no fue casual, otros casos similares fueron reportados en los meses y años siguientes en la misma región norteamericana y en toxicómanos cuyo factor común era el consumo de una misma droga, a la que llamaron “nueva heroína” o “china blanca” (Ruttenber y col., 1984). No fue sino hasta 1983, que Langston y sus colaboradores, al analizar muestras de drogas incautadas de laboratorios clandestinos, demostraron que el responsable de este síndrome es un subproducto de la síntesis de MPPP; el MPTP. En efecto, el MPTP reproduce un síndrome de tipo parkinsoniano una vez que es administrado por vía parenteral en los monos (primates no humanos). Este síndrome se acompaña de lesiones histológicas del sistema nigroestriatal (Burns y col., 1983; Jenner y col., 1984; Langston y col., 1983a, 1984a,b).

Estudios histológicos y bioquímicos, practicados en primates no humanos, mostraron una pérdida importante de las células pigmentadas de la sustancia *nigra*, asociada a una gran pérdida de la dopamina estriatal (Burns y col., 1983; Langston y col., 1984a). Basados en esta observación, Calne y Langston (1983) propusieron la hipótesis de que la EP idiopática podría ser causada por toxinas ambientales que, como el MPTP, serían capaces de inducir una degeneración selectiva e irreversible de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

Después de su acumulación intracerebral, el MPTP es transformado en un metabolito activo; el 1-metil-4-fenil-piridinio (MPP⁺). Esta biotransformación es catalizada por la enzima monoamino-oxidasa del tipo B (MAOB), que se encuentra en los astrocitos (Chiba y col., 1984; Heikkila y col., 1984b, 1984c; Langston y col., 1984b). El MPP⁺ es posteriormente liberado al espacio extracelular por un mecanismo aún desconocido y recapturado de manera selectiva por las neuronas dopaminérgicas mediante el sistema de recaptura de la dopamina (Javitch y Snyder, 1984; Schinelli y col., 1988). Una vez en el interior de la neurona, el MPP⁺ inhibe la cadena respiratoria mitocondrial a nivel del complejo I y provoca anoxia, con la

consiguiente muerte celular (Figura 7; Mizuno y col., 1987; Nicklas y col., 1985; Vyas y col., 1986).

Figura 7. Representación esquemática del metabolismo del MPTP. Después de su administración sistémica, atraviesa la barrera hematoencefálica. Una vez en el cerebro, el MPTP es convertido en MPDP⁺ por la enzima MAO-B en células no dopaminérgicas, como las células gliales o neuronas serotoninérgicas y posteriormente es transformado en MPP⁺ por un mecanismo aún desconocido. Posteriormente, el MPP⁺ es liberado al espacio extracelular mediante un mecanismo también desconocido. El MPP⁺ es captado por las neuronas dopaminérgicas que lo introducen por medio del transportador de dopamina (DAT) (Modificado de Dauer y Przedborski, 2003).



LA VÍA NASAL

En diversos estudios se ha demostrado que el déficit en las funciones olfatorias y cognitivas precede a los síntomas motores clásicos que caracterizan a la EP y que las pruebas olfatorias en los pacientes podrían contribuir al diagnóstico temprano de esta enfermedad (Doty y col., 1988; Stern y col., 1994; Tissingh y col., 2001; Becker y col., 2002; Santin y col., 2010). Sin embargo, la causa primaria de la EP continua siendo desconocida. Estudios epidemiológicos han revelado que la incidencia de la EP se ve incrementada como consecuencia a la exposición de ciertas toxinas ambientales (Gorell y col., 1998).

En un estudio reciente, se demostró que la mayoría de las alteraciones que presentan los ratones C57BL/6, que previamente fueron expuestos a una dosis intranasal única de MPTP (Figura 8), fueron similares a las observadas en las fases tempranas de la EP (Prediger y col., 2010). Los ratones presentaron una pérdida moderada de neuronas dopaminérgicas nigrales, lo que ocasionó un déficit olfatorio y de memoria, sin la presencia, sin embargo, de alteraciones motoras. Tal exposición

disminuyó los niveles de la enzima TH en el bulbo olfatorio, el cuerpo estriado y la sustancia *nigra* a través de mecanismos de apoptosis, reduciendo la concentración de dopamina en diferentes estructuras cerebrales, como el bulbo olfatorio, el estriado y la corteza prefrontal, pero no en el hipocampo (Prediger y col., 2010). Estos hallazgos refuerzan la idea de que el sistema olfatorio representa una ruta particularmente sensible para el transporte de neurotoxinas al sistema nervioso central, que podría estar relacionada con la etiología de la EP.

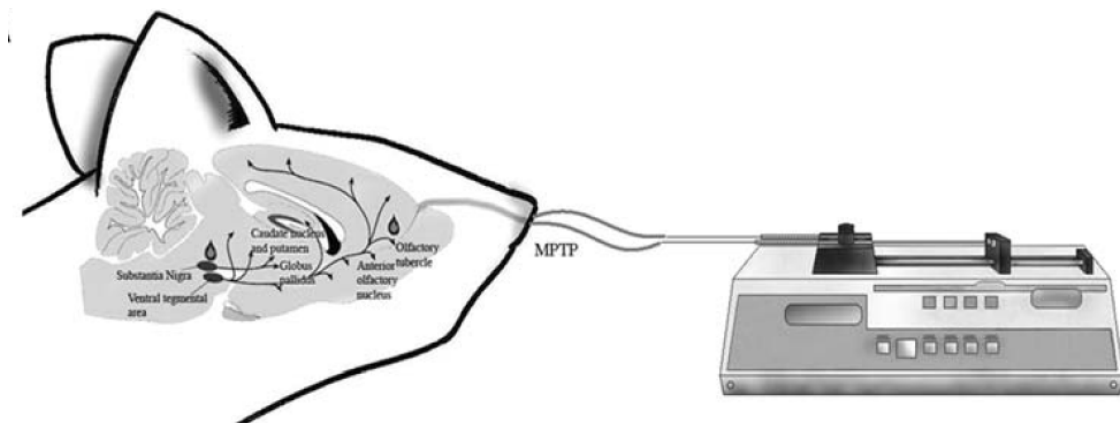


Figura 8. Modelo murino de intoxicación intranasal con MPTP. Representación esquemática de la administración intranasal de MPTP en el ratón (Tomado de Prediger y col., 2010).

En 1992, Doty y colaboradores, publicaron un estudio comparativo de la disfunción olfatoria presentada por pacientes cuyo parkinsonismo fue provocado por la administración intravenosa (i.v.) de MPTP, pacientes con EP idiopática y sujetos sanos. Sus estudios demostraron que los resultados de las pruebas olfatorias de los sujetos con parkinsonismo inducido por la administración de MPTP i.v. no fueron significativamente distintos en comparación con los sujetos sanos. Estos resultados sugieren que el parkinsonismo inducido por el MPTP, vía i.v., no se acompaña de alteraciones olfativas (Doty y col., 1992a). Ello se puede explicar debido a que la MPP⁺, metabolito tóxico del MPTP, no cruza la barrera hematoencefálica (Stahlbaum y col., 1991). Este hallazgo coincide con la hipótesis del “vector olfatorio” la cual, como ya se indicó, postula que la EP puede ser originada o catalizada por agentes que ingresan el cerebro por la vía de la mucosa olfatoria, la cual evita el paso por la barrera hematoencefálica.

Únicamente algunos tipos celulares neurales del sistema nervioso humano son propensos a desarrollar agregados proteicos anormales. Otros tipos neuronales, incluso a pesar de estar localizados en contigüidad a las células nerviosas afectadas, mantienen su morfología y su integridad funcional. Esto significa que el daño neuronal en el cerebro de pacientes con EP no es aleatorio y obedece a ciertas reglas, trazando un patrón de lesión a su paso (Braak y col., 1998; 2003). La razón de esta marcada vulnerabilidad de algunos tipos de neuronas y de la resistencia de otras aún no se ha dilucidado. La EP muestra una gran afinidad por áreas corticales y núcleos de la sustancia gris. Todos los centros somato-sensoriales o viscerosensoriales del cerebro medio, en su mayor parte, se encuentran intactos, excepto las estructuras del sistema olfatorio.

Estos resultados también proporcionan nuevas perspectivas en modelos experimentales de la EP, lo que indica que la administración i.v. de MPTP representa un valioso modelo murino para el estudio de las primeras etapas de la EP y para las nuevas estrategias terapéuticas para restaurar los procesos sensoriales y cognitivos en la EP.

Algunos autores han propuesto la teoría del origen dual para la EP (Hawkes y col., 2007), en la cual plantean la existencia de un agente, un neurotóxico o probablemente un patógeno neurotrópico viral, que accede al cerebro a través de dos rutas: la vía nasal, a través del bulbo olfatorio, que además se corresponde con la hipótesis del vector olfatorio (Figura 9) y la vía gástrica, en la que el virus llega al sistema nervioso de forma retrógrada, a través de los nervios parasimpáticos (Braak y col., 2004), en ambos casos por transporte axonal y transmisión transináptica (Saper y col., 1987; Pearson, 1996).

Es claro que muchos virus neurotrópicos pueden acceder al cerebro a través de la vía nasal y que las condiciones del huésped son fundamentales en la modulación de la virulencia y patogenicidad del virus. Actualmente se realizan experimentos en modelos animales para intentar responder a preguntas como: ¿pueden los virus persistir en el tejido nervioso o en el cerebro luego de una infección? o bien ¿pueden las proteínas virales alterar la función sináptica?

Ya existen antecedentes de estos conceptos, por ejemplo: Howe y Bodian (1941, 1942) demostraron que el sitio de entrada del virus de la poliomielitis determina su

tropismo en el sistema nervioso central; sólo el bulbo olfatorio y el núcleo septal participaron de forma selectiva después de la inoculación intranasal. Por otra parte y de forma similar, Anderson y Field (1983) mostraron que la inoculación intranasal del virus del herpes simple tipo 1 (HSV1) afecta al bulbo olfatorio, la corteza piriforme y el hipocampo, así como áreas precisas del tronco encefálico. Estas regiones no fueron afectadas cuando el virus se inoculó por vía i.v. o intracerebral.

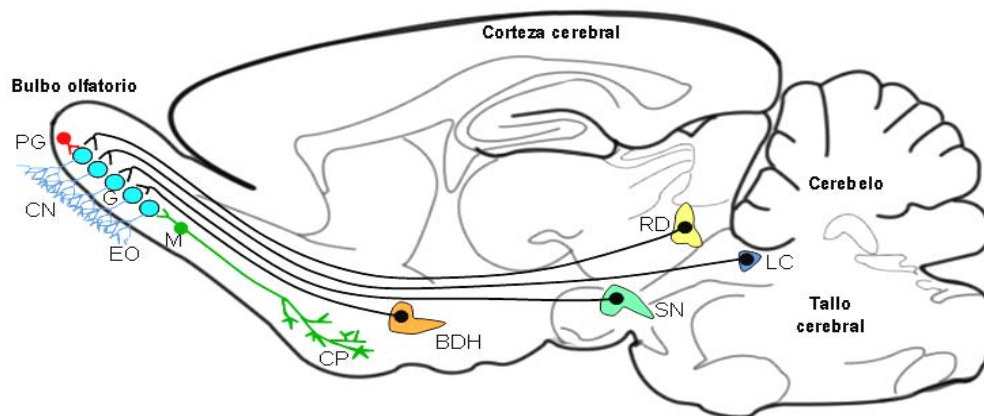


Figura 9. Vías olfatorias en la infección viral de áreas específicas del sistema nervioso. La hipótesis del “vector olfatorio” postula que la EP puede ser originada por agentes que ingresan el cerebro a través de la mucosa olfatoria. CN–cavidad nasal, EO–epitelio olfatorio, G–glomérulo olfatorio, M–células mitrales, PG–células periglomerulares, CP–corteza piriforme, BDH–banda diagonal horizontal, SN–*sustantia nigra*, RD–rafe dorsal, LC–*locus coeruleus* (Tomado de Rojas-Mayorquín y col., 2009).

CONSIDERACIONES FINALES

Hasta el momento, queda claro que las disfunciones olfatorias son parte de los primeros signos clínicos identificables en la EP idiopática, sin embargo se ha estudiado que también forman parte de los primeros signos clínicos de otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y el complejo parkinsonismo-demencia de Guam (Doty y col., 1991). Se ha sugerido, por tanto, que las pruebas olfatorias no pueden ser utilizadas para distinguir entre estas tres enfermedades y que la disfunción olfatoria de estas patologías refleja un substrato neurológico común. La vía olfatoria ha demostrado ser una puerta de entrada “directa” para patógenos y tóxicos hacia el sistema nervioso central de mamíferos, queda aún por esclarecer con mayor precisión los mecanismos de transporte y daño de cada uno de estos agentes.

REFERENCIAS

1. Anderson JR, Field HJ. (1983). The distribution of herpes simplex type I antigen in mouse central nervous system after different routes of inoculation. *J Neurol Sci.*, 60(2):181-195.
2. Becker G, Müller A, Braune S, Büttner T, Benecke R, Greulich W, Klein W, Mark G, Rieke J, Thümler R. (2002) Early diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol.*, 249 Suppl 3:III/40-8.
3. Braak H, de Vos RA, Jansen EN, Bratzke H, Braak E. (1998) Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog Brain Res.*, 117:267-85.
4. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.*, 24(2):197-211.
5. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.*, 318(1):121-134.
6. Brecknell JE, Dunnett SB, Fawcett JW. (1995) A quantitative study of cell death in the substantia nigra following a mechanical lesion of the medial forebrain bundle. *Neuroscience.*, 64(1):219-27.
7. Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM y Kopin IJ. (1983). A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 80(14):4546-4550.
8. Burns RS, Markey SP, Phillips JM, Chiueh CC. (1984) The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the monkey and man. *Can J Neurol Sci.*, (1 Suppl):166-8.
9. Calne DB, Langston JW. (1983) Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet.*, 2(8365-66):1457-1459.
10. Chiba K, Trevor A, Castagnoli N Jr. (1984). Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.*, 120(2):574-578.
11. Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. (1967) Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med.*, 276(7):374-9.
12. Dauer W, Przedborski S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 39(6):889-909.
13. Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1(3):249-254.
14. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.* 175(2):303-17.
15. Di Monte D, Sandy MS, Ekström G, Smith MT. (1986) Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 137(1):303-9.
16. Di Monte DA, (2003) The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol.* 2(9):531-538.
17. Doty RL, Deems DA, Stellar S. (1988). Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology.* 38:1237-1244.
18. Doty RL, Perl DP, Steele JC, Chen KM, Pierce JD Jr, Reyes P, Kurland LT. (1991). Odor identification deficit of the parkinsonism-dementia complex of Guam: equivalence to that of Alzheimer's and idiopathic Parkinson's disease. *Neurology.* 41(5 Suppl 2):77-81.
19. Doty RL, Singh A, Tetrud J, Langston JW. (1992a). Lack of major olfactory dysfunction in MPTP-induced parkinsonism. *Ann Neurol.* 32:97-100.
20. Doty RL, Stern MB, Pfeiffer C, Gollomp SM, Hurtig HI. (1992b). Bilateral olfactory dysfunction in early stage medicated and unmedicated idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 55:138-142.
21. Doty RL. (2008). The Olfactory Vector Hypothesis of Neurodegenerative Disease: Is It Viable? *Ann Neurol.* 63(1):7-15.
22. Faull RL, Mehler WR. (1978) The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. *Neuroscience.* 3(11):989-1002.
23. Gasser T. (2001) Genetics of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 248(10):833-840.
24. Gerlach M, Riederer P. (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm.* 103(8-9):987-1041.
25. German DC, Manaye K, Smith WK, Woodward DJ, Saper CB. (1989). Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Ann Neurol.* 26(4):507-514

26. Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ. (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*. 50(5):1346-50.
27. Hamre K, Tharp R, Poon K, Xiong X, Smeyne RJ. (1999). Differential strain susceptibility following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration acts in an autosomal dominant fashion: quantitative analysis in seven strains of *Mus musculus*. *Brain Res*. 828(1-2):91-103.
28. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. (2007). Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 33(6):599-614.
29. Heikkila RE, Cabbat FS, Manzino L, Duvoisin RC. (1984a). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice. *Neuropharmacology*. 23(6):711-3.
30. Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. (1984b). Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*. 224(4656):1451-1453.
31. Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC. (1984c). Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature*. 311(5985):467-469.
32. Hirsch EC, Höglinger G, Rousset E, Breidert T, Parain K, Feger J, Ruberg M, Prigent A, Cohen-Salmon C, Launay JM. (2003) Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *J Neural Transm Suppl*; (65):89-100.
33. Howe HA, Bodian D. (1941) Second Attacks of Poliomyelitis: An Experimental Study. *J Exp Med*. 74(2):145-66
34. Howe HA, Bodian D. (1942). Neural mechanisms in poliomyelitis. Common wealth Foundation.
35. Hyland K, Beaman BL, LeWitt PA, DeMaggio AJ. (2000) Monoamine changes in the brain of BALB/c mice following sub-lethal infection with *Nocardia asteroides* (GUH-2). *Neurochem Res*. 25(4):443-8.
36. Javitch JA, Snyder SH. (1984). Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol*. 106(2):455-456.
37. Jenner P, Rupniak NM, Rose S, Kelly E, Kilpatrick G, Lees A, Marsden CD. (1984). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci Lett*. 50(1-3):85-90.
38. Jenner P. (2008) Functional models of Parkinson's disease: a valuable tool in the development of novel therapies. *Ann Neurol*. 64 Suppl 2:S16-29.
39. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983a). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 219(4587):979-980.
40. Langston JW, Ballard PA Jr. (1983b). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*. 309(5):310.
41. Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. (1984a). 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett*. 48(1):87-92.
42. Langston JW, Langston EB, Irwin I. (1984b). MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl*. 100:49-54.
43. Ma Y, Dhawan V, Mentis M, Chaly T, Spetsieris PG, Eidelberg D. (2002). Parametric mapping of [18F]FPCIT binding in early stage Parkinson's disease: a PET study. *Synapse*. 45(2):125-33.
44. Mitra N, Mohanakumar KP, Ganguly DK. (1994). Resistance of golden hamster to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: relationship with low levels of regional monoamine oxidase B. *J Neurochem*. 62(5):1906-12.
45. Mizuno Y, Saitoh T, Sone N. (1987). Inhibition of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem Biophys Res Commun*. 143(3):971-976.
46. Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci*. 36(26):2503-2508.
47. Parkinson J. (1817). *An Essay on Shaking Palsy*, Sherwood, Neeley and Jones, London.
48. Payami H, Zarepari S. (1998). Genetic epidemiology of Parkinson's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 11(2):98-106.
49. Pearson, R.C. (1996). Cortical connections and the pathology of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration*. 5(4):429-434.

50. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276(5321):2045-2047.
51. Prediger RD, Aguiar AS Jr, Rojas-Mayorquin AE, Figueiredo CP, Matheus FC, Ginestet L, Chevarin C, Bel ED, Mongeau R, Hamon M, Lanfumey L, Raisman-Vozari R. (2010). Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. 17(2):114-129.
52. Quinn NP, Rossor MN, Marsden CD. (1987). Olfactory threshold in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 50:88-89.
53. Riachi NJ, Harik SI. (1988). Strain differences in systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice correlate best with monoamine oxidase activity at the blood-brain barrier. *Life Sci*. 42(23):2359-2363.
54. Rojas-Mayorquín A.E., Guzmán-Brambila C., Álvarez-Palazuelos L.E. y Ortuño-Sahagún D. (2009) Características moleculares del virus de la Influenza A (H1N1) y su posible relación con la enfermedad de Parkinson. *Archivos de Ciencia* 1(2):102-112.
55. Rutenber AJ, Luke JL. (1984). Heroin-related deaths: new epidemiologic insights. *Science*. 226(4670):14-20.
56. Santin R, Fonseca VF, Bleil CB, Rieder CR, Hilbig A. (2010) Olfactory function and Parkinson's disease in Southern Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 68(2):252-7.
57. Schwarting RK, Huston JP. (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*. 50(2-3):275-331.
58. Shah A, Garzon-Muvdi T, Mahajan R, Duenas VJ, Quiñones-Hinojosa A. (2010). Animal models of neurological disease. *Adv Exp Med Biol*. 671:23-40.
59. Saper, C.B., Wainer, B.H., German, D.C. (1987). Axonal and transneuronal transport in the transmission of neurological disease: potential role in system degenerations, including Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 23(2):389-98.
60. Schinelli S, Zuddas A, Kopin IJ, Barker JL, di Porzio U. (1988). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine metabolism and 1-methyl-4-phenylpyridinium uptake in dissociated cell cultures from the embryonic mesencephalon. *J Neurochem*. 50(6):1900-1907.
61. Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. (2005). The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 134(1):57-66.
62. Stahlbaum CC, y col. (1991) Enhanced MPTP toxicity in the rat using intranasal administration. *Soc Neurosci (Abst)*;17:1275.
63. Steece-Collier K, Maries E, Kordower JH. (2002). Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(22):13972-13974.
64. Stern MB, Doty RL, Dotti M, Corcoran P, Crawford D, McKeown DA, Adler C, Gollomp S, Hurtig H. (1994) Olfactory function in Parkinson's disease subtypes. *Neurology*. 44(2):266-8.
65. Sundström E, Strömberg I, Tsutsumi T, Olson L, Jonsson G. (1987). Studies on the effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57BL/6 mice. Comparison with three other strains of mice. *Brain Res*. 405(1):26-38.
66. Tam S, Barry DP, Beaman L, Beaman BL. (2002) Neuroinvasive *Nocardia asteroides* GUH-2 induces apoptosis in the substantia nigra in vivo and dopaminergic cells in vitro. *Exp Neurol*. 177(2):453-60.
67. Tintner R, Jankovic J. (2002) Treatment options for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 15(4):467-76.
68. Tissingh G, Berendse HW, Bergmans P, DeWaard R, Drukarch B, Stoof JC, Wolters EC. (2001) Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. *Mov Disord*. 16(1):41-6.
69. Vyas I, Heikkila RE, Nicklas WJ. (1986). Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurochem*. 46(5):1501-1507.
70. Ward CD, Hess WA, Calne DB. (1983). Olfactory impairment in Parkinson's disease. *Neurology*. 33:943-946.
71. Zappia M, Nicoletti A, Muñoz-S D, Tapia-Núñez J. (2009) Reconsiderations in the treatment of Parkinson's disease with levodopa: some pharmacodynamic evidence. *Rev Neurol*. 1-15;49(1):33-40.

LEPTINA Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

**¹Folch J, ²Sureda FX, ^{1,2}Pedros I, ³Junyent F, ³Verdaguer E, ⁴Auladell C,
³Pallàs M, ³Camins A.**

¹Unitat de Bioquímica y ²Unitat de Farmacologia, Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.

³Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), CIBERNED, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

⁴Departament de Biologia Celular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

RESUMEN

Se ha demostrado que la obesidad y la resistencia a la insulina son factores de riesgo en la enfermedad de Alzheimer (AD). La leptina, más allá de sus funciones en el control de la ingesta a nivel hipotalámico, modula la supervivencia neuronal. Los receptores de leptina se expresan ampliamente en el sistema nervioso central, comparten rutas de señalización con el receptor de insulina, y ambos participan en procesos neurodegenerativos. Estudios epidemiológicos y modelos animales demuestran que la restricción calórica constituye un factor protector frente a la AD. La restricción calórica activaría la síntesis de sirtuína 1 (SIRT1), la cual modula la actividad de moléculas clave en la supervivencia neuronal como p53, NF-κB y FOXO1. Por otro lado, la activación del receptor a leptina tendría efectos neuroprotectores frente al progreso de la AD, inhibiendo la formación de placas amiloideas, así como la formación de ovillos intracelulares de proteína Tau.

LA LEPTINA COMO AGENTE NEUROPROTECTOR

Las enfermedades neurodegenerativas producen un deterioro de las capacidades cognitivas y motoras de los pacientes afectados. Todos estos procesos tienen en común la pérdida selectiva de neuronas mediante procesos de apoptosis. Las causas inductoras de los procesos apoptóticos son muy diversas, pudiéndose citar tanto la

disminución en los niveles de factores tróficos, la excesiva generación de radicales libres, la excitotoxicidad, la neurotoxicidad por xenobióticos, causas genéticas y la presencia de acúmulos proteicos anómalos, entre otras. Sin embargo, el conocimiento de los procesos implicados en la neuroprotección es aún fragmentario. Recientemente, la atención se ha centrado en diferentes moléculas de origen endógeno, y que han demostrado poseer capacidad para revertir los efectos tóxicos generados en modelos de estudio de enfermedades neurodegenerativas. Estas moléculas son, además, interesantes por la elevada tolerabilidad a las mismas por parte de los pacientes y por la escasa presencia de efectos adversos tras su administración. Entre éstas, la más representativa sería la leptina [1, 2].

El gen de la leptina (*OB*) codifica un polipéptido de 16 kDa [3]. La secuencia primaria, así como los datos cristalográficos indican que la leptina adopta una estructura tridimensional en hélice, y que recuerda a la de algunas citoquinas, como la interleucina 2 (Figura 1).

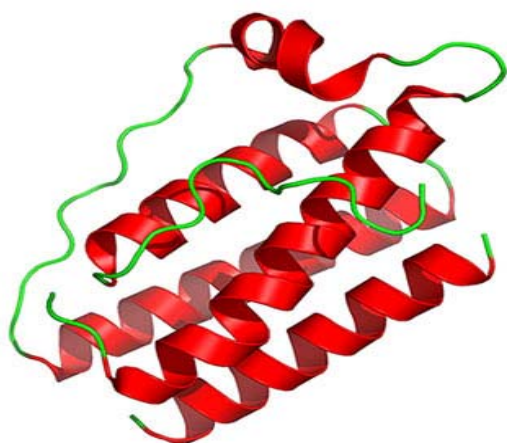


Figura 1. Estructura tridimensional de la molécula de leptina.

La leptina ha sido ampliamente caracterizada como hormona adipostática. La hormona actúa como elemento señalizador liberado por el tejido adiposo blanco con capacidad para regular a nivel cerebral el control de la ingesta y la homeostasis energética. Sin embargo, más allá de sus funciones en el control de la ingesta a nivel hipotalámico, la leptina está implicada en el control de la supervivencia de las células neuronales [2]. Se ha demostrado que el tejido adiposo no es el único capaz de sintetizar leptina, y que ésta también es producida por el cerebro. En cerebros de rata, las células que presentan niveles elevados del receptor de leptina, también

presentan niveles elevados de leptina y de su mRNA, y que éstos colocalizan con las neuronas [4].

El cerebro capta la leptina circulante a través del plexo coroideo, el cual la transfiere al medio extracelular del mismo y lo concentra hasta niveles aproximadamente de 0,7 nM (11,8 ng/ml) en el fluido cerebroespinal [5]. La amplia expresión del receptor de la leptina en el conjunto del tejido cerebral sugiere que esta molécula debe ejercer otras funciones menos conocidas. Diferentes grupos de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo presentan niveles elevados de receptor de leptina, como las que forman la sustancia *nigra*, cuya pérdida masiva constituye el agente etiológico de la enfermedad de Parkinson. Diferentes estudios desarrollados en modelos *in vitro* muestran que la leptina es neuroprotectora en células dopaminérgicas [6], pero también en otras áreas cerebrales. Se ha demostrado que la administración exógena de leptina revierte la pérdida de células dopaminérgicas sometidas a la acción tóxica de la neurotoxina 6-hidroxidopamina, y que este efecto está relacionado con la modulación de la vía de la quinasa mitógena extracelular (MEK) y de las quinasas reguladas extracelularmente (ERK) [1]. También se ha establecido que la leptina es capaz de proteger a neuronas hipocampales en diferentes modelos *in vitro* de privación de factores tróficos [7] y en modelos *in vivo* de daño isquémico [8].

SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE LEPTINA EN NEURONAS

El receptor de leptina en humanos (Ob-R) es miembro de la superfamilia de receptores de citoquinas de clase I (gp130) [9, 10].

Los receptores de leptina están ampliamente expresados en el sistema nervioso central, comparten rutas de señalización comunes a las del receptor de insulina y se sabe que ambos mecanismos pueden actuar sinérgicamente mediando la evolución de los procesos neurodegenerativos. En el cerebro humano, la máxima expresión de la forma larga del receptor de leptina (Ob-Rb) tiene lugar en el núcleo arqueado y en la eminencia media del hipotálamo, aunque también se expresa de forma importante en el hipocampo, en el giro dentado y en las áreas CA1, seriamente afectadas en la enfermedad de Alzheimer [11] (Figura 2). En ratones, se pueden detectar niveles elevados del mRNA correspondiente a la isoforma Ob-Rb en el núcleo infundibular o

arqueado (ARC), dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH) y núcleo ventral premamilar (PMV). Niveles más moderados de expresión se pueden encontrar en el núcleo hipotalámico paraventricular y en el área hipotalámica lateral (LHA) [12]. Aún menores son los niveles que se encuentran en el núcleo paraventricular (PVH) [13, 14, 15].

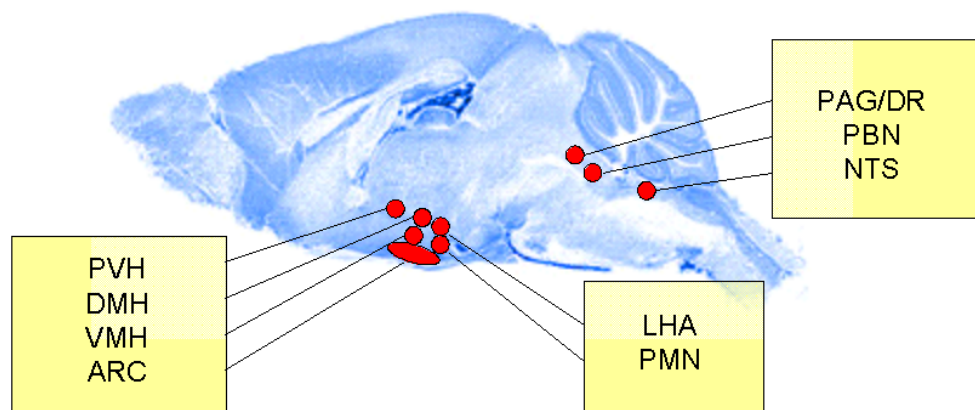


Figura 2. Distribución de los Ob-Rb funcionales en el cerebro de ratón. Núcleo infundibular o arqueado (ARC), dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH), núcleo ventral premamilar (PMV), área hipotalámica lateral (LHA), núcleo paraventricular (PVH), el núcleo dorsomedial (DR), sustancia gris periacueductal (PAG), núcleo parabranchial (PBN), núcleo del tracto solitario (NTS).

Utilizando técnicas de inmunohistoquímica en secciones de cerebro de ratones tratados con leptina, se ha observado la inducción del transductor de señal del receptor de leptina y factor de transcripción 3 (STAT3) [16, 17] y de c-Fos [18, 19]. En general, se ha observado que la actividad del gen Ob-Rb y de STAT3 y c-Fos se solapan en regiones hipotalámicas. Sin embargo, ensayos más sensibles de la actividad STAT3 y c-Fos han permitido observar zonas sensibles a leptina fuera del hipotálamo. En particular, el núcleo dorsomedial (DR), sustancia gris periacueductal (PAG), el núcleo parabranchial (PBN) situado en el cerebro medio, y en el núcleo del tracto solitario (NTS). Un trabajo reporta también la activación de STAT3 en el córtex piriforme [16], consistente con altos niveles de mRNA de Ob-Rb [15]. Sin embargo, ninguno de los ensayos inmunohistoquímicos ha permitido observar señalización dependiente de insulina en el tálamo o en el cerebelo, lo cual pone en cuestión la posible presencia de receptores de leptina funcionales en estas regiones.

A partir del gen del receptor de la leptina se sintetizan un total de seis isoformas distintas, todas ellas proteínas de membrana con la excepción de la isoforma soluble Ob-Re. La forma Ob-Rb es la isoforma más larga y la única responsable de la señalización inducida por la unión del ligando. Se ha descrito que la unión de la leptina a su receptor provoca la oligomerización del receptor y la consecuente activación de la Jano quinasa 2 (JAK2). Este proceso culmina con la activación de diferentes vías de señalización intracelular. Entre ellas se pueden citar la de JAK2-STAT3, la ruta de fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), la quinasa AKT, la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), y la de la proteína quinasa activada por 5'-AMP [12] (Figura 3). La activación del Ob-Rb por leptina aumenta la actividad de las quinasas JAK2, asociadas a las zonas proximales del receptor. JAK2 fosforila diversos sustratos intracelulares como son Y985 y Y1138 (pertenecientes a Ob-Rb) y a Y705 (perteneciente a STAT3). La fosfotirosina fosfatasa del dominio SHP-2 (SHP2) es importante para la activación para la regulación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) [12]. Tanto STAT3, PI3K y ERK modularían procesos transcripcionales. La expresión de la molécula supresora de la señalización por citoquinas (SOCS)-3 está regulada por STAT3 y, al igual que la fosfatasa de tirosinas (PTP1B), son reguladores negativos del receptor OB-Rb. PI3k estaría igualmente implicada en diferentes procesos de la neurona, independientes de los procesos de transcripción, y en la liberación de neurotransmisores. Más recientemente, se ha propuesto que Cdk5/p35 modularían la señalización activada por leptina y mediada por STAT3 [20].

SIRTUÍNAS, LEPTINA Y NEURODEGENERACIÓN

Las sirtuínas pertenecen a la familia de las desacetilasas de histonas, y en ese sentido tienen una función relacionada con la compactación del DNA. Además, tienen actividad desacetilasa sobre numerosos sustratos relacionados con el control del ciclo celular, la supervivencia neuronal y la apoptosis. Más recientemente, se ha puesto de manifiesto su relación con los mecanismos de señalización dependientes de leptina.

Se ha descrito que en ratones *ob/ob*, la administración de leptina estimula la actividad transcripcional del gen de la sirtuína 3 en tejido adiposo [21], y que, en

ratones obesos deficientes en leptina, la expresión de sirtuína 1 (SIRT1) en el hipotálamo es aberrante [22]. La molécula SIRT1 se expresa en diferentes órganos y tejidos: hígado, músculo esquelético, tejido adiposo, páncreas y cerebro. En estos órganos, SIRT1 controla procesos de supervivencia celular, neuronal, la gluconeogénesis hepática, la secreción de insulina y la movilización de grasas. Hasta la fecha, se ha descrito que la SIRT1 desacetila aproximadamente una docena de sustratos entre los que se encuentran P53, FOXO 1,3 y 4 (FoxOs), NF- κ B, PPAR γ y PGC-1 α . Otros importantes sustratos de la actividad de SIRT1 son las histonas H1, H3 y H4, cuya desacetilación está relacionada con el silenciamiento génico.

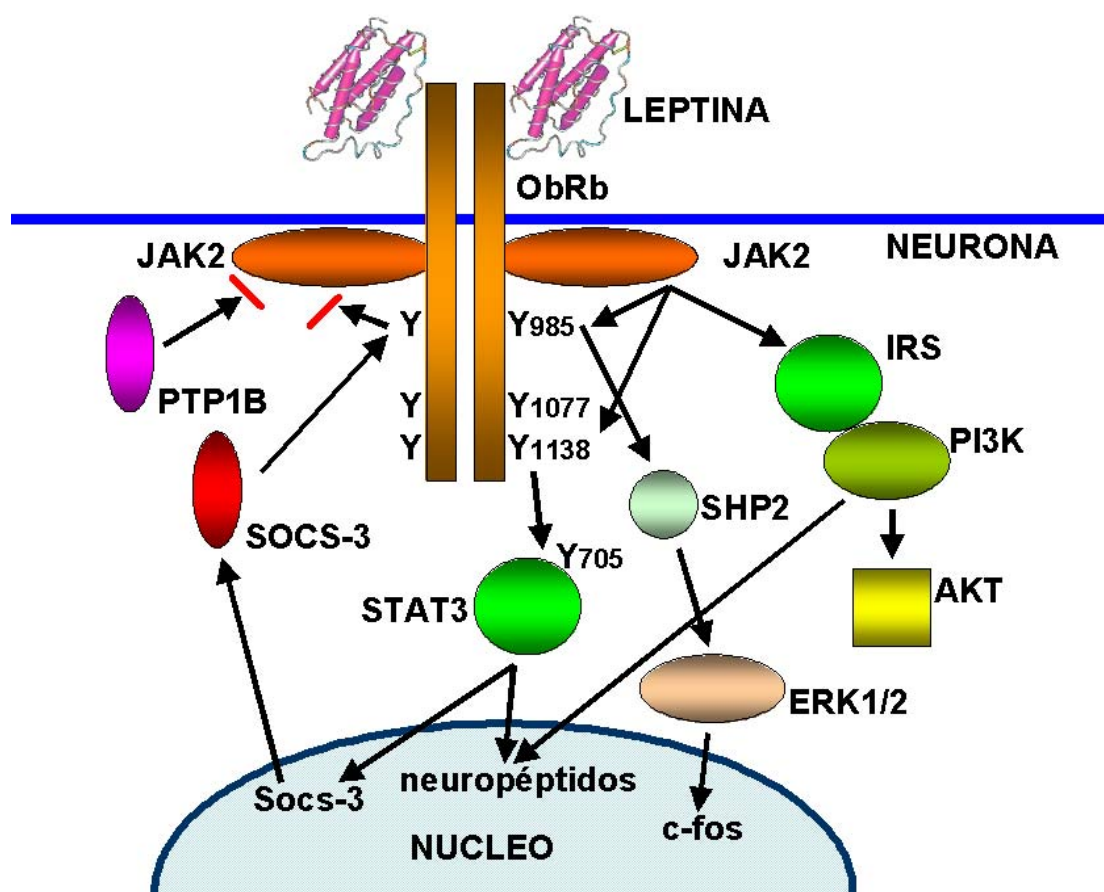


Figura 3. Mecanismo de señalización del receptor a leptina. La activación del Ob-Rb por leptina eleva la actividad de las quinasas JAK2 que fosforilan diversos sustratos intracelulares como Y985 y Y1138 (pertenecientes a Ob-Rb) y a Y705 (perteneciente a STAT3). La fosfotirosina fosfatasa del dominio SHP-2 (SHP2) es importante para la activación para la regulación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Tanto STAT3, como PI3K y ERK modularían procesos transcripcionales. La expresión de la molécula supresora de la señalización por citoquinas (SOCS)-3 es regulada por STAT3 y, al igual que la fosfatasa de tirosinas (PTP1B), son reguladores negativos del receptor OB-Rb. Adaptado de Bjørbaek y Kahn, 2004 [12].

Diferentes estudios muestran que SIRT1 activaría las funciones de FoxOs, facilitando su translocación al núcleo y su actividad transcripcional, mientras que inhibiría la señalización mediada por NF- κ B. Se ha descrito que FoxO/DAF-16 están implicados en la resistencia de las células frente al estrés oxidativo y al daño celular, mientras que el papel fundamental del sistema de señalización de NF- κ B se relaciona con la inducción de la inflamación y de las respuestas inmunitarias innatas. Las funciones de FoxOs y de NF- κ B están estrictamente reguladas por procesos post-transcripcionales de fosforilación, ubiquitinación y acetilación, en los que interviene SIRT1.

Se ha sugerido que la estimulación de la actividad de las sirtuínas, particularmente de SIRT1, puede constituir un tratamiento potencial en la enfermedad de Parkinson [23]. Los aumentos en la actividad de las sirtuínas, y SIRT1 en particular, se relacionan con situaciones de restricción calórica, o a la exposición a moléculas como el resveratrol. Numerosos trabajos describen su papel neuroprotector derivado de la capacidad para inhibir la actividad de p53 por desacetilación, protegiendo así a las neuronas de procesos de degeneración axonal y de la apoptosis [24] (Figura 4).

En condiciones de hiperglicemia, se produce un metabolismo anormal de la mitocondria, responsable de la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) responsables de la activación de la apoptosis y de la neurodegeneración. Se ha demostrado que diversas moléculas de origen endógeno, como la leptina, tienen la capacidad para revertir éstos efectos tóxicos [1, 2]. Resultados publicados por nuestro grupo sugieren que la neurotoxina mitocondrial MPP⁺ provocaría la disminución de la actividad SIRT-1 en células granulares del cerebelo [25]. Al parecer, la generación de especies reactivas de oxígeno provocaría este efecto sobre las sirtuínas a través de AKT.

OBESIDAD, RESISTENCIA A LA INSULINA Y NEURODEGENERACIÓN

Los niveles plasmáticos de leptina están altamente relacionados con el volumen de grasa corporal, y sería la población femenina la que presentaría unos niveles más altos en cualquiera de los diferentes grados de adiposidad corporal [26, 27]. El dimorfismo de género se mantiene en mujeres postmenopáusicas, aunque con unos

niveles de secreción de leptina algo menores que en mujeres en edad fértil, en todos los casos superiores a los de la población masculina. Los niveles de leptina en plasma están comprendidos entre los 0 ng/ml (en casos de deficiencia congénita de leptina) a más de 100 ng/ml en casos de obesidad mórbida. Por otro lado, se observan variaciones circadianas en la concentración plasmática de leptina, mayores a últimas horas del día que por la mañana.

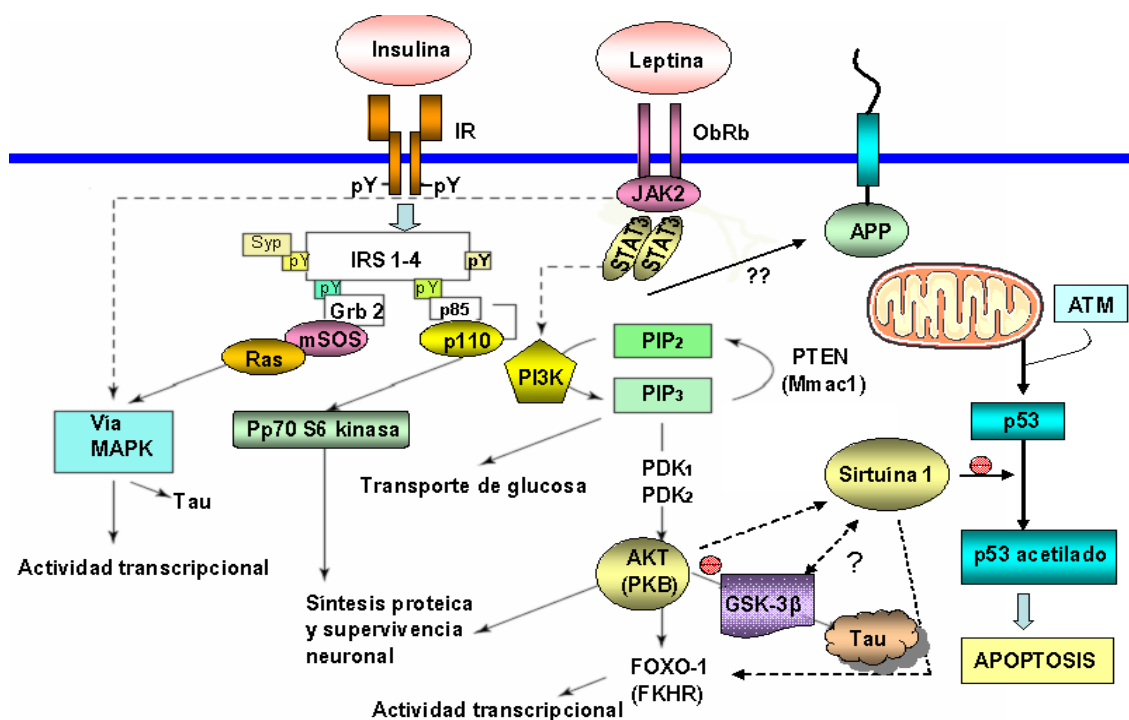


Figura 4. Interacción entre los mecanismos de señalización del receptor de insulina (IR) y del receptor de leptina. IR y Ob-Rb actúan sinérgicamente potenciando la supervivencia celular. Las moléculas STAT3 del Ob-Rb estimularían la supervivencia celular activando a PI3K y a AKT. Ésta última inhibiría la actividad GSK-3β, fosforilando la serina 9 de ésta, y disminuiría la fosforilación de la proteína Tau. A su vez, AKT podría estimular la actividad de las sirtuínas 1. El estrés oxidativo mitocondrial, y el daño que éste ocasiona al material genético de la célula, estimularían la actividad proapoptótica de p53. Las sirtuínas 1 inhibirían la estabilización de p53 desacetilando la molécula, bloqueando de esa forma la activación de la apoptosis, y ejerciendo así su efecto neuroprotector.

La leptina se ha utilizado en numerosos ensayos para el tratamiento de la obesidad. Los resultados obtenidos en cuanto a pérdida de peso han sido discretos, especialmente cuando se ha administrado en monoterapia, y a pesar de la buena tolerancia de los pacientes frente al tratamiento. Ello puede explicarse por el hecho de que los pacientes obesos presentan hiperleptinemia y, por ello, son resistentes a los incrementos en los niveles de leptina [28].

Por otro lado, diferentes estudios clínicos demuestran una clara asociación entre obesidad y la alteración de los mecanismos de señalización dependientes de insulina [29], y una mayor susceptibilidad a sufrir procesos neurodegenerativos [30, 31], mientras que estudios *in vivo* con ratones obesos muestran la aparición de alteraciones propias de la neurodegeneración que se observa en la enfermedad de Alzheimer [32].

La leptina, además de ejercer sus efectos neuroprotectores mediante la activación de vías de supervivencia como las de JAK2-STAT3, AKT y MEK/ERK [7], también ejerce sus efectos protectores incrementando la actividad de la vía PI3-K, utilizando para ello el mecanismo de señalización de los receptores de insulina [33]. Se ha puesto de manifiesto que la pérdida significativa de funcionalidad de los mecanismos de señalización dependientes de insulina estaría relacionada con la progresión de las enfermedades neurodegenerativas. Se ha descrito que la obesidad humana está asociada a una disminución de la expresión de los receptores de dopamina D2 en el núcleo estriado, y que en individuos obesos la disponibilidad de leptina en cerebro está disminuida [34]. Igualmente, se puede sugerir que existe una interacción entre la leptina y las alteraciones en el metabolismo de la dopamina en el cerebro de los enfermos de Parkinson.

En animales sanos, el bloqueo de los receptores de insulina implicaría también una disminución en la fosforilación de AKT y de GSK-3 β , lo que conduciría a un incremento significativo de la fosforilación de la proteína Tau [33]. Por lo tanto, existiría una base molecular que explicaría la relación que se ha propuesto entre el desarrollo de diabetes de tipo 2 y el progreso de la enfermedad de Alzheimer [35]. Tanto la resistencia a la insulina como el péptido amiloide alterarían la cascada de señalización constituida por PI3-K, AKT y GSK-3 β , contribuyendo con ello a reforzar la progresión de la enfermedad. Además, se ha descrito que la leptina puede actuar disminuyendo la actividad beta secretasa, lo que disminuiría los depósitos de péptido β -amiloide.

LEPTINA Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Estudios *in vivo* e *in vitro* han puesto de manifiesto que la leptina puede mejorar la homeostasis de la proteína beta amiloide (A β), reducir los niveles de fosforilación de

la proteína Tau, así como mejorar las capacidades cognitivas en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer sometidos a tratamiento crónico con leptina. Se ha sugerido la existencia de un elemento mediador, entre el receptor de leptina y los diferentes mecanismos moleculares de control metabólico y de generación de los depósitos de A β y de proteína Tau. Diferentes evidencias sugieren que este elemento mediador podría ser la quinasa activada por AMP (AMPK) [36].

La actividad anormal de AMPK podría generar alteraciones en el metabolismo lipídico y en la composición de las membranas de las células neuronales, afectando a su fluidez. Esto último podría repercutir en la producción de A β . Se ha demostrado que la unión de leptina a su receptor puede modular positivamente la actividad AMPK, dificultando con ello la generación de los depósitos de A β y de proteína Tau. El mecanismo preciso no se conoce suficientemente aun, pero hay evidencias de que implican la actividad de STAT3. Está bien caracterizado que AMPK puede inhibir a GSK-3 β , estimulando la actividad de AKT (Figura 5). Por el contrario, la cascada de señalización entre AMPK y el control de A β está menos definida.

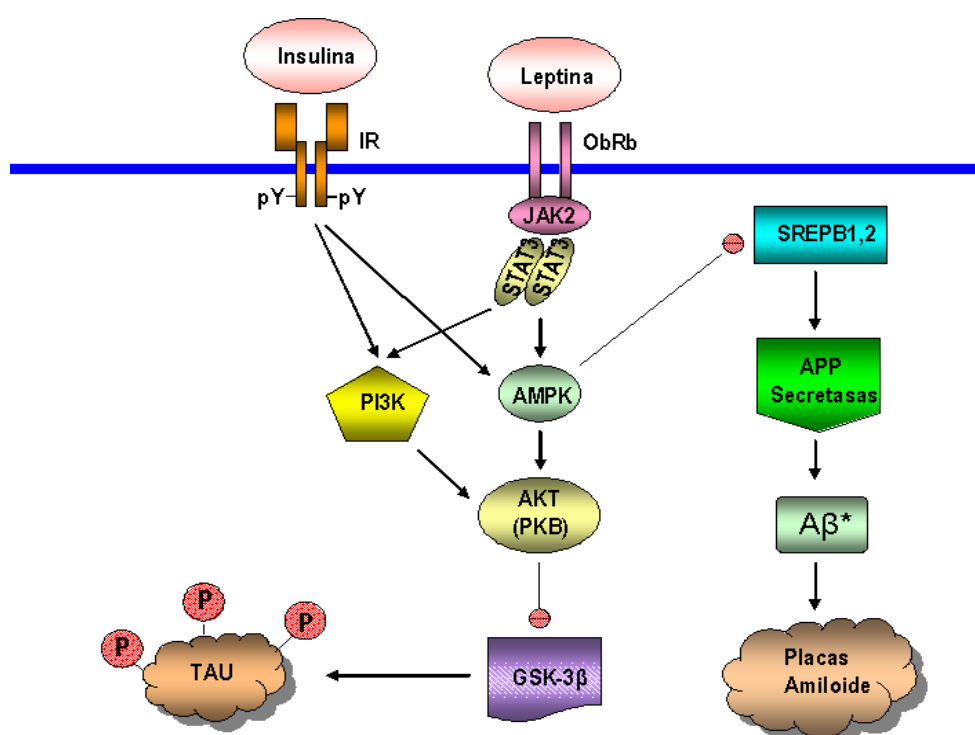


Figura 5. AMPK puede inhibir a GSK-3 β , estimulando la actividad de AKT, y puede inhibir los factores de transcripción SREBP1,2, regulados negativamente por la leptina, y que están implicados en el control del metabolismo lipídico. Existen evidencias de que también la insulina tiene la capacidad de modular AMPK. Además de AMPK, insulina y leptina tienen como diana común a PI3K que, a su vez, inhibe la actividad de GSK-3 β por un proceso de fosforilación en la serina 9, lo cual impide la hiperfosforilación de la proteína Tau.

La activación de AMPK puede inhibir los factores de transcripción SREBP1,2 que se sabe están implicados en el control del metabolismo lipídico (ácido graso sintasa, palmitoil transferasa, etc.) y que se ha descrito que están regulados negativamente por la leptina [37]. Existen evidencias de que también la insulina tiene la capacidad de modular AMPK. Además de AMPK, insulina y leptina tienen como diana común a PI3K que, a su vez, inhibe la actividad de GSK-3 β por un proceso de fosforilación en la serina 9, que lleva a cabo AKT. La diana de la actividad quinasa de GSK-3 β es la proteína tau, lo cual pone de manifiesto la relevancia del papel de la vía de señalización de AMPK, PI3K y AKT en el desarrollo de la AD. Se ha propuesto que la deficiencia en leptina contribuiría a una insuficiente estimulación del mecanismo molecular dependiente de AMPK lo cual, a su vez, incrementaría los niveles de A β y de Tau fosforilada, además de provocar un descenso en los niveles generales de actividad metabólica [36].

METFORMINA COMO FÁRMACO POTENCIALMENTE ÚTIL EN EL TRATAMIENTO DE LOS PROCESOS NEURODEGENERATIVOS

Como ya se ha comentado, la obesidad dificulta el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica (BHE), lo cual constituye un factor de riesgo en la AD. Por ello, los tratamientos que permitan mejorar el transporte de la leptina, o que incrementen la sensibilidad a la misma, pueden poseer una función potencialmente protectora frente a los procesos neurodegenerativos. Por ejemplo, recientemente se ha propuesto que CCK-8, un agonista de receptores colecistoquinina 1 poseería tal efecto [38], puesto que CCK-8 incrementaría la captación de leptina por parte del cerebro. Sin embargo, un tratamiento crónico es complejo dado que debe ser administrado intraperitonealmente, puede ser costoso, y disminuye la ingesta y el peso corporal, como se ha demostrado en estudios con ratones. Por otro lado, también podrían tener interés los fármacos que disminuyen la resistencia a la insulina. Los fármacos del grupo de las tiazolidindionas y de las biguanidas son utilizados en el tratamiento de la diabetes por tener ese mecanismo de acción. Además, se han publicado diferentes trabajos que demuestran que las tiazolidindionas (pioglitazona, rosiglitazona, etc.) presentan efectos neuroprotectores, por ejemplo en procesos de isquemia. Sin embargo, estos

fármacos están sujetos a efectos adversos de consideración, como son el incremento de peso y la retención de líquidos, así como incrementos en la adiposidad subcutánea y en los niveles de leptina.

La metformina es un fármaco que pertenece al grupo de las biguanidas. Se ha demostrado que el fármaco aumenta la sensibilidad de los receptores de insulina y leptina, disminuye la liberación de glucosa por parte del hígado, disminuye los niveles plasmáticos de colesterol y, además disminuye el índice de masa corporal [24]. Se han publicado muy pocos trabajos que muestran los efectos neuroprotectores de la metformina *in vitro* [39], sin embargo, se está trabajando para determinar los posibles efectos beneficiosos sobre las células neuronales, gracias a una mayor sensibilización del receptor de leptina. También sería de gran interés conocer el efecto del tratamiento *in vivo* con metformina sobre la actividad sirtuína, y sobre los mecanismos de señalización dependientes de insulina.

Agradecimientos

El trabajo en el laboratorio de Sureda FX y Folch J está siendo financiado con fondos del ministerio español de Educación y Ciencia (SAF-2009-13093), y por el Fondo de Investigación Sanitaria y el Instituto de Salud Carlos III (PI080400 y PS09/683 01789).

REFERENCIAS

1. Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin XM, Chen J (2007) Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* Nov 23;282(47):34479-91.
2. Signore AP, Zhang F, Weng Z, Gao Y, Chen J (2008) Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *J Neurochem.*; Sep;106(5):1977-90.
3. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
4. Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E (1999) Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology.* Dec;140(12):5995-8.
5. Kurrimbux D, Gaffen Z, Farrell CL, Martin D, Thomas SA (2004) The involvement of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers in the distribution of leptin into and out of the rat brain. *Neuroscience*;123(2):527-36.
6. Dicou E, Attoub S, Gressens P (2001) Neuroprotective effects of leptin *in vivo* and *in vitro*. *Neuroreport.*; 12(18):3947-51.
7. Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP (2008) Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem.* Jan 18;283(3):1754-63.
8. Zhang F, Chen J (2008) Leptin protects hippocampal CA1 neurons against ischemic injury. *J Neurochem.* Oct;107(2):578-87.

9. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271.
10. Heshka JT, Jones PJ (2001) A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. *Life Sci* 69, 987-1003.
11. Huang XF, Koutcherov I, Lin S, Wang HQ, Storlien L (1996) Localization of leptin receptor mRNA expression in mouse brain. *Neuroreport* 7, 2635-2638.
12. Bjørbaek C, Kahn BB (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:305-31.
13. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996) Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by *in situ* hybridization. *FEBS Lett* 387:113-116.
14. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM (1997) Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7001-7005.
15. Elmquist JK, Bjørbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB (1998) Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395:535-547.
16. Hubschle T, Thom E, Watson A, Roth J, Klaus S, Meyerhof W (2001) Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J Neurosci* 21:2413-2424.
17. Muenzberg H, Huo L, Nillni EA, Hollenberg AN, Bjorbaek C (2003) Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 144:2121-2131.
18. Elmquist JK, Ahima RS, Maratos-Flier E, Flier JS, Saper CB (1997) Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology* 138:839-842.
19. Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, Elmquist JK (2000) Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 423:261-281.
20. He Y, Kastin AJ, Hsueh H, Pan W (2009) The Cdk5/p35 kinases modulate leptin-induced Stat3 signaling. *J Mol Neurosci.* 395:535-547.
21. Zhang W, Della-Fera MA, Hartzell DL, Hausman D, Baile CA (2008) Adipose tissue gene expression profiles in ob/ob mice treated with leptin. *Life Sci.*;83(1-2):35-42.
22. Ramadori G, Lee CE, Bookout AL, Lee S, Williams KW, Anderson J, Elmquist JK, Coppari R (2008) Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. *J Neurosci.* Oct 1;28(40):9989-96.
23. Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, Volk CB, Maxwell MM, Rochet JC, McLean PJ, Young AB, Abagyan R, Feany MB, Hyman BT, Kazantsev AG (2007) Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science.*;317(5837):516-9.
24. Kim YW, Kim JY, Park YH, Park SY, Won KC, Choi KH, Huh JY, Moon KH (2007) Metformin restores leptin sensitivity in high-fat-fed obese rats with leptin resistance. *Diabetes.* Mar;55(3):716-24. Mar;55(3):716-24.
25. Pallàs M, Pizarro JG, Gutierrez-Cuesta J, Crespo-Biel N, Alvira D, Tajés M, Yeste-Velasco M, Folch J, Canudas AM, Sureda FX, Ferrer I, Camins A (2008) Modulation of SIRT1 expression in different neurodegenerative models and human pathologies. *Neuroscience.* Jul 17;154(4):1388-1397.
26. Prins JB, O'Rahilly S (1997) Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci (Lond)* 29, 3-11.
27. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL (1996) Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3424-3427.
28. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, McCamish M (1999) Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282, 1568-1575.
29. Gil A, María Aguilera C, Gil-Campos M, Cañete R (2007) Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br J Nutr.* Oct;98 Suppl 1:S121- 27.
30. Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galldiks N, Küstermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Brüning JC (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 2;101(9):3100-5.

31. Bruce-Keller AJ, Keller JN, Morrison CD (2009) Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochim Biophys Acta*. May;1792(5):395-400.
32. Moroz N, Tong M, Longato L, Xu H, de la Monte SM (2008) Limited Alzheimer-type neurodegeneration in experimental obesity and type 2 diabetes mellitus. *J Alzheimers Dis*. Sep;15(1):29-44.
33. Plum L, Schubert M, Brüning JC (2005) The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*. Mar;16(2):59-65.
34. Wang S, Yu C, Sun C, Liu Z (2001) Changes and relations of leptin, growth hormone and insulin during puberty in obese and non-obese children. *Wei Sheng Yan Jiu*. Jul;30(4):219-20.
35. Zhao WQ, Townsend M (2008) Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*.
36. Tezapsidis N, Johnston JM, Smith MA, Ashford JW, Casadesus G, Robakis NK, Wolozin B, Perry G, Zhu X, Greco SJ, Sarkar S (2009) Leptin: a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. Apr;16(4):731-40.
37. Farr SA, Banks WA, Morley JE (2006) Effects of leptin on memory processing. *Peptides* 27, 1420-1425.
38. Cano V, Merino B, Ezquerra L, Somoza B, Ruiz-Gayo M (2008) A cholecystokinin-1 receptor agonist (CCK-8) mediates increased permeability of brain barriers to leptin. *Br. J. Pharmacol*. Jul;154(5):1009-15.
39. El-Mir MY, Detaille D, R-Villanueva G, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, Fontaine E, Almeida A, Leverve X (2008) Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol Neurosci*;34(1):77-87.

EFFECTOS NEUROPSICOLÓGICOS Y EPIGENÉTICOS DEL EJERCICIO FÍSICO EN EL ENVEJECIMIENTO

¹Pallàs-Lliberia M, ²Kaliman P, ¹Bayod-Gimeno S, ³Escorihuela RM.

¹Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

²Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Barcelona, España

³Instituto de Neurociencias, Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, España.

“Sólo el ser humano y muy pocos otros animales tienen el privilegio de envejecer. Y ello, que representa un triunfo biológico de la especie humana, tiene su contrapartida en los problemas médicos y asistenciales que esta población de ancianos requiere. Claramente, el envejecimiento constituye hoy un motivo de preocupación central en el mundo occidental” (Mora-Teruel F. Envejecimiento cerebral. Capítulo 2. En: Enfermedades neurodegenerativas, Ed Farmaindustria. Serie Científica. 2002)

INTRODUCCIÓN

La cita que encabeza este capítulo resume, en pocas líneas, una de las principales preocupaciones de la sociedad actual: el envejecimiento de la población mundial. De forma simple, puede parecer que el problema sólo consiste en la cantidad creciente de personas ancianas y el consiguiente incremento en el gasto sanitario que ello conlleva. No debemos olvidar que si la población alcanza edades más avanzadas, es, en gran parte, gracias a la medicina preventiva y paliativa, que alarga y mantiene funcionales muchos de los sistemas y órganos imprescindibles para la vida. No obstante, aparte de problemas económicos o de insostenibilidad del sistema sanitario, se debe tratar este tema bajo otro punto de vista, mucho más trascendental que el anterior.

ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso gradual en el que hay un deterioro estructural progresivo de procesos celulares y biomoleculares; se asocia a un conjunto de

condiciones patológicas en las que se incluyen las enfermedades vasculares, la enfermedad de Alzheimer, osteoporosis, sarcopenia y disfunciones hepáticas. Además, con el envejecimiento hay pérdida de masa corporal y de masa ósea e incremento en la masa de tejido adiposo; y como consecuencia, con la edad también aumenta la incidencia de una serie de trastornos como son las enfermedades inflamatorias, dislipidemias, aterosclerosis, obesidad, resistencia a la insulina (RI) y *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). En humanos, estos factores de riesgo incrementan la probabilidad de padecer un accidente cardio- y cerebrovascular en las etapas finales de la vida, y algunos de estos factores, como la dislipidemia, se encuentran asociados a una mayor incidencia de demencia senil (7, 62). Al mismo tiempo, cada una de estas condiciones se asocia con un deterioro funcional progresivo, pérdida de la independencia y finalmente incapacidad. Todavía no se conocen con precisión los mecanismos subyacentes al envejecimiento, pero sí se conoce que en él participan, entre otros, procesos inflamatorios, daño oxidativo, disfunciones mitocondriales y apoptosis (14).

Es evidente que el paso del tiempo en cualquier organismo vivo, y en el ser humano en concreto, provoca un deterioro de todos los órganos y sistemas vitales. El cerebro nos preocupa especialmente, en él se asienta todo lo que de humano y social tiene el hombre, y aunque sea un órgano común a todos los seres vivos superiores, nos diferencia indiscutiblemente de todos los demás ya que en él radica la inteligencia y nuestra capacidad de pensar, razonar, y sentir; facultades característicamente humanas.

Básicamente los motivos expuestos son los que hacen que el mundo científico se haya volcado en los últimos años al estudio de un conjunto de enfermedades que se agrupan bajo la denominación de neurodegenerativas, aquellas que como su nombre indica provocan una degeneración de las células que constituyen el sistema nervioso: las neuronas y la glía. El interés creciente por estas enfermedades se debe fundamentalmente al incremento de la esperanza de vida respecto a décadas anteriores, cuando la longevidad era mucho menor. Hace tan sólo unas décadas, muchas de estas patologías no llegaban a manifestarse y el porcentaje de individuos que presentaban daños severos en el sistema nervioso central antes de la muerte era mucho menor.

Recientemente se ha sugerido que las funciones cerebrales y la salud mental podrían estar moduladas por la interacción de factores centrales y periféricos. Se ha descrito el síndrome metabólico como un grupo de factores de riesgo que incluyen obesidad abdominal, niveles bajos de lipoproteína de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL), hipertensión e hiperglicemia, las cuales se asocian con un alto riesgo de desarrollar *diabetes mellitus* y enfermedades cardiovasculares. Además, estudios recientes demostraron que el síndrome metabólico puede ser predictivo de deterioro cognitivo a los tres años de seguimiento en una muestra latina de 1,624 personas (63) y en otra muestra de 2,632 personas africanas y blancas (64). Estos datos concuerdan con otros trabajos donde se ha visto que las alteraciones metabólicas o cardiovasculares pueden ser factores de riesgo de deterioro cognitivo asociado al envejecimiento o de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA). Todo ello sugiere que los factores asociados a estilos de vida que disminuyen los riesgos cardiovasculares y metabólicos pueden también reducir los riesgos de desarrollar déficit cognitivos o EA.

Existen diversas teorías sobre el proceso de envejecimiento que curiosamente no se excluyen entre sí, y que se sustentan en hallazgos científicos:

- 1.-La *teoría genética o de la telomerasa*: los telómeros (secuencias de ácidos nucleicos situadas al final de los cromosomas) se acortan en cada división celular. Este acortamiento se cree que provoca daño celular debido a que la célula se vuelve incapaz de duplicarse correctamente. Cada vez que la célula se divide, se duplica a ella misma con una mayor probabilidad de errores que la vez anterior, lo que lleva a una disfunción celular, el envejecimiento y la muerte.
- 2.-La *teoría neuroendocrina*: se explica por el desgaste del sistema neuroendocrino. Este sistema es una complicada red que controla la liberación de diferentes hormonas a través del hipotálamo. A medida que envejecemos, el hipotálamo pierde su precisión reguladora, y los receptores tisulares de respuesta a las hormonas también se vuelven menos sensibles. Otras teorías postulan que esta desregulación del hipotálamo se debe al daño que provoca el aumento de cortisol con la edad.
- 3.-La *teoría de los radicales libres*: esta teoría fue desarrollada en 1956 por Denham Harman (25). El término radical libre se refiere a cualquier molécula que tenga un

electrón desaparejado que le confiere la capacidad de reaccionar con otras moléculas de manera destructiva. La formación de radicales libres es el resultado de la producción de energía en nuestro organismo y su fuente principal se encuentra en la mitocondria. Nuestro organismo está dotado de diferentes sistemas antioxidantes para protegernos de su producción constante. Sin embargo, la dieta, el tabaco y otros factores asociados al estilo de vida pueden acelerar la formación de estos radicales.

- 4.-La *teoría de la membrana*: indica que los cambios causados por la edad perjudican los procesos químicos y eléctricos de la célula. Con la edad las membranas celulares se vuelven menos lipídicas, lo cual impide un correcto funcionamiento, y puede provocar algunas acumulaciones tóxicas, como la de lipofucsina (depósitos que se han visto aumentados en el cerebro, corazón, pulmones y piel en ancianos).
- 5.-La *teoría del límite*: propuesta por Hayflick (26), sugiere que las células humanas están limitadas en el número de veces que pueden dividirse, se ha determinado este número en 50, después del cual, la célula deja de dividirse y muere.
- 6.-La *teoría de la disminución mitocondrial*: la mitocondria produce toda la energía que la célula necesita en forma de ATP. Al hacerlo, genera gran cantidad de radicales libres, y como con el envejecimiento disminuyen las defensas antioxidantes, a lo largo del tiempo estos radicales libres hacen que la mitocondria se vuelva menos eficiente y decaiga la producción de ATP.

Tabla 1. Teorías sobre el proceso de envejecimiento

TEORIA	CARACTERÍSTICAS
Genética o de la telomerasa	Los telómeros se acortan en cada división, causando disfunciones celulares
Neuroendocrina	Desregulación hipotalámica y/o desensibilización tisular a hormonas
De los radicales libres	Aumento de producción de moléculas reactivas que provocan daño o muerte celular.
De la membrana	La membrana lipídica pierde consistencia con la edad, la célula puede acumular productos tóxicos
Del límite	Existe un límite en el número de veces que la célula puede dividirse
De la disminución mitocondrial	Menor producción de energía celular en forma de ATP debida a la disfunción mitocondrial por acumulación de radicales libres

Todas estas teorías, y otras, se pueden correlacionar entre sí y tienen puntos en común que permiten su unificación.

En términos generales, se acepta que envejecer causa una pérdida de la capacidad de mantener el medio interno del individuo cuando se enfrenta a cambios en el entorno. De esta manera, el individuo pierde su capacidad de homeóstasis y la mayoría de los órganos vitales sufre fenómenos asociados con atrofia y degeneración. Entre los más sensibles se encuentran los órganos formados por células post-mitóticas, como las neuronas, los cardiomiocitos, o las células musculares (58).

ENVEJECIMIENTO Y EPIGENÉTICA

Actualmente se sabe que la expresión de los genes no está sólo definida por la secuencia primaria del DNA sino también por la forma en que diversas modificaciones a nivel de cromatina marcan y programan la actividad génica. En efecto, existen capas de información molecular que se acumulan sobre el DNA (epigenética: sobre el genoma) sin modificar su secuencia primaria y son capaces de regular la expresión génica de manera estable, duradera y potencialmente reversible. Los mecanismos epigenéticos incluyen modificaciones de tipo covalente en histonas, metilación de DNA y síntesis de RNAs no codificantes entre los que destacan los microRNAs por su posible papel en el proceso de envejecimiento y en la manifestación de diversas patologías (18). La epigenética está adquiriendo un papel central en la biomedicina del siglo XXI ya que constituye un nuevo paradigma molecular para entender la relación entre la base genética del individuo, el entorno, el estilo de vida, la enfermedad y el envejecimiento. El conocimiento de los mecanismos epigenéticos implicados en el envejecimiento podría permitir en un futuro desarrollar estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas con base epigenética para tratar enfermedades asociadas al envejecimiento.

Las alteraciones del epigenoma actualmente se reconocen como parte del envejecimiento y de los fenotipos patológicos que se le asocian. Se ha observado un patrón generalizado de desmetilación con el envejecimiento en la mayoría de los tejidos de vertebrados (61). En tejidos mitóticamente activos esto podría reflejar una deficiencia en el mantenimiento de la maquinaria de remetilación, proceso que

ocurre durante la replicación del ADN. Esta pérdida generalizada de 5-metilcitosina durante el envejecimiento podría permitir la expresión de diversos genes y de retrotransposones silenciados, aumentando la inestabilidad genómica. Tra y colaboradores (52, 61) compararon 2,000 *loci* en linfocitos T humanos aislados de recién nacidos, adultos, y personas de edad avanzada y encontraron que más de 29 *loci* (aproximadamente 1%) cambiaban su patrón de metilación con el envejecimiento. En el mismo estudio, los autores evaluaron los patrones de metilación en linfocitos T y otros tejidos en ratones envejecidos sin detectar cambios significativos. Sin embargo, otros autores han descrito cambios en patrones de metilación durante el envejecimiento en ratas y ratones (60). En un estudio reciente, se examinaron los cambios en metilaciones del DNA durante el desarrollo, maduración y envejecimiento de la corteza cerebral humana, desde las 17 semanas de gestación hasta los 104 años de edad, incluyendo 2 grupos de personas con enfermedades mentales graves, Alzheimer y esquizofrenia (47). Se encontró un aumento progresivo con la edad en la metilación de 8 de los 50 *loci* examinados, y un aumento rápido durante los primeros meses o años de vida en 18 *loci*.

En conclusión, numerosos estudios sobre metilación del DNA indican que durante el envejecimiento existe una relajación del control epigenético. Aunque dichas observaciones podrían relacionarse con fenotipos de déficit cognitivo y otros signos y enfermedades asociadas al envejecimiento, la relevancia funcional de los cambios epigenéticos asociados al envejecimiento (exceptuando diversas formas de cáncer) es aún desconocida.

ESTILOS DE VIDA, EJERCICIO Y ENVEJECIMIENTO

Un estilo de vida, destacado como prioritario por la Organización Mundial de la Salud, es la conducta activa para combatir el sedentarismo, considerado un factor de riesgo y relacionado especialmente con las enfermedades cardiovasculares y con las muertes prematuras). Se ha constatado que los individuos que practican regularmente ejercicio físico muestran mayor salud cardiovascular que los sedentarios (41). Diversos estudios apoyan la idea de que el ejercicio físico como estilo de vida, puede reducir el impacto de factores de riesgo en la salud cardiovascular, el balance lípidos-colesterol, el metabolismo energético, la

utilización de glucosa, la sensibilidad a la insulina y la inflamación (17). También se han observado beneficios del ejercicio físico a nivel psicológico y cognitivo como por ejemplo la prevención y mejora de estados depresivos y de trastornos de ansiedad, la reducción del estrés, el retraso del deterioro de las funciones cognitivas e intelectuales en personas mayores, y la mejora de la autoconfianza y de la propia imagen corporal (5).

Normalmente con el envejecimiento disminuye la actividad física y con ello, la masa y la funcionalidad del músculo esquelético; el ejercicio regular también previene esta pérdida (45). Se ha visto que con la actividad muscular asociada al ejercicio físico mejora la eficiencia del sistema de capilares y aumenta el aporte de oxígeno a diferentes zonas, entre ellas el cerebro, de manera que, con el ejercicio, las neuronas aumentan su actividad metabólica y la captación de oxígeno, y también aumentan las neurotrofinas y la resistencia a factores estresantes (43). Todo ello concuerda con el hecho de que la práctica regular de ejercicio físico y el mantenimiento de un estilo de vida activo durante la edad adulta se asocia con una disminución del riesgo de padecer deterioro cognitivo leve (DCL), EA en la vejez (46) y con una mejora de la función cognitiva en gente mayor con este tipo de trastornos. Algunos estudios epidemiológicos ya han comenzado a mostrar efectos específicos en relación al período de entrenamiento, el tipo de intervención o la duración de las sesiones realizadas (15). Por ejemplo, Larson y colaboradores (33) encontraron que la incidencia de EA era significativamente inferior en las personas de más de 65 años que hacían un mínimo de 15 minutos de ejercicio 3 veces a la semana en comparación con las personas de la misma edad que hacían actividad física menos de 3 veces a la semana. En otro estudio, andar un mínimo de 45 minutos, tres veces por semana durante 6 meses mejoró la eficiencia de personas mayores de 65 años en tareas atencionales y aumentó el volumen de sustancia gris en regiones de los lóbulos frontal y superior temporal (15, 32).

EJERCICIO FÍSICO EN ANIMALES DE LABORATORIO: ESTUDIOS CONDUCTUALES

En el campo de la investigación básica, los tipos de ejercicio físico más frecuentemente utilizados en roedores son la rueda de actividad, el tapiz rodante y el nado.

En el tapiz rodante, entrenamientos cortos de 5-10 días y otros más largos de 8-12 semanas mejoraron el aprendizaje espacial de los animales en el laberinto acuático de Morris (1, 2, 4, 20). Albeck y colaboradores (3) mostraron que ratas de 23 meses de edad entrenadas en el tapiz rodante durante 7 semanas (intensidad muy moderada, 15 minutos diarios) se orientaban más rápidamente y mejor que los animales sedentarios, sin que aparecieran diferencias en los niveles de neurotrofinas. Sin embargo, Hansalik y colaboradores (50) no encontraron mejoría en el aprendizaje de animales de 18 meses. Por otro lado, uno de los trabajos más completos realizados con animales envejecidos de 23 meses de edad donde se compararon efectos del entrenamiento en el tapiz y la rueda de actividad, mostró que el grupo de entrenamiento voluntario en la rueda tenía mayor supervivencia que el grupo entrenado en el tapiz, aunque los autores fueron cautelosos en la interpretación de los datos porque había mucha variación en cuanto al ejercicio realizado por los diferentes sujetos (40). Sin embargo, debe señalarse que según se haya utilizado rata o ratón y un modelo u otro para entrenar a los animales, los efectos descritos en pruebas de conducta espontánea y de conflicto experimental no son del todo consistentes. Así, el entrenamiento en el tapiz rodante y el acceso a la rueda de actividad aumentó, disminuyó o no mostró efectos en la conducta ansiosa de los animales (10, 11). También se han descrito ciertas contradicciones con respecto a los efectos del ejercicio físico en tareas cognitivas que conllevan un cierto grado de estrés, en función del entrenamiento previo y del tipo de prueba donde han sido evaluados (8, 44).

Los estudios de ratones con acceso voluntario a la rueda de actividad son los que han demostrado resultados cognitivos más contundentes, que se extienden a parámetros celulares y neuroquímicos. Así, en animales adultos y envejecidos el ejercicio físico voluntario: i) mejora el rendimiento en tareas de aprendizaje y memoria (23, 56); ii) aumenta la proliferación neuronal (31, 54, 55); y iii) afecta la estructura neuronal y la funcionalidad de los mecanismos celulares asociados a procesos de aprendizaje (22, 32). A este respecto, el IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) podría tener un papel mediador clave en relación a las alteraciones de niveles de BDNF y los procesos de neurogénesis (13, 53). De hecho, y con relación a las sospechadas interacciones entre los sistemas periférico y el nervioso central que

apuntábamos anteriormente, Trejo y colaboradores (53) han demostrado que la deficiencia de IGF-1 generada a partir de una disfunción hepática provoca deterioro en una tarea de aprendizaje espacial, efecto que se revierte mediante la administración sistémica de IGF-I a los animales (Figura 1).

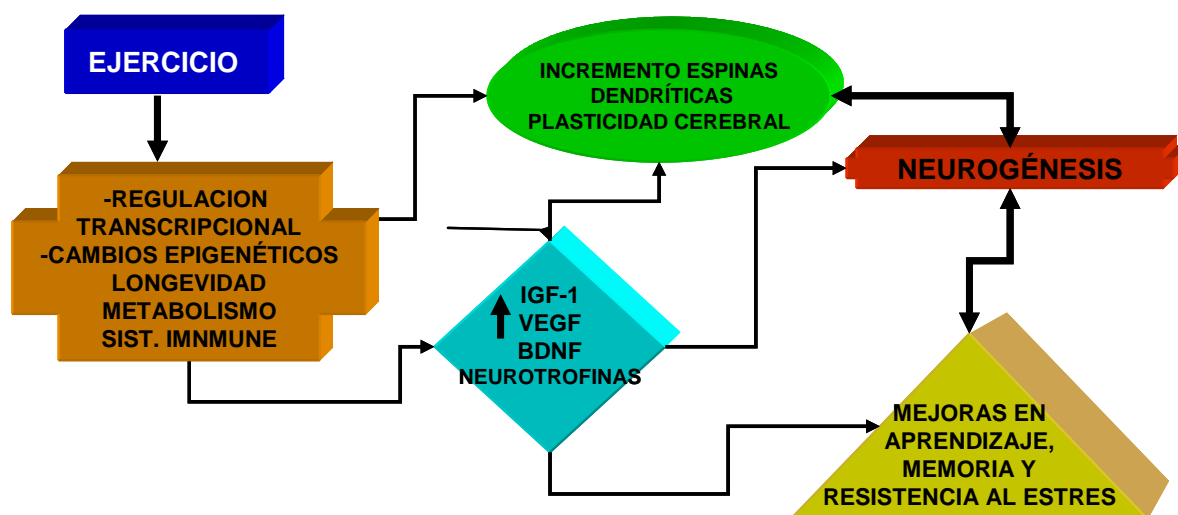


Figura 1. Efecto del ejercicio en parámetros celulares, neuroquímicos y cognitivos.

EJERCICIO FÍSICO EN ANIMALES DE LABORATORIO: ESTUDIOS TRANSCRIPCIONALES Y EPIGENÉTICOS

Durante los últimos años, se han comenzado a emplear técnicas de *microarrays* que permiten realizar análisis de cientos o miles de genes simultáneamente, para investigar de manera sistemática los patrones de expresión génica asociados al ejercicio físico (48, 59). Sin embargo, existe una gran variabilidad entre estudios, ya que los datos generados se ven muy influenciados por el tipo de ejercicio físico estudiado, su intensidad, el estado de entrenamiento previo, edad, género y estado de salud entre otras variables. Así, se ha demostrado recientemente que ratas con alta capacidad aeróbica innata medida por su capacidad de correr y seleccionadas artificialmente a lo largo de 16 generaciones presentaban una mejor función cardíaca con respecto a ratas con baja capacidad aeróbica seleccionadas de la misma manera (12). Estas últimas presentaban acumulación de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular similares a los que caracterizan el síndrome metabólico en humanos. En cuanto a expresión génica, se observaron 1,540 genes con expresión

diferencial en ventrículo izquierdo al comparar ratas con alta y baja capacidad aeróbica. Las diferencias correspondían sobre todo a vías relacionadas con metabolismo cardíaco y crecimiento y estrés celular (12). Diferentes estudios han comenzado a demostrar que la expresión génica en cerebro es también sensible al entrenamiento físico, en particular en el hipocampo, estructura clave en los procesos de aprendizaje y memoria, especialmente sensible a procesos disfuncionales y degenerativos durante el envejecimiento e implicada en la regulación del estado de ánimo y respuesta antidepresiva (36). Un estudio del perfil génico en hipocampo de ratones después de 7 días de ejercicio físico voluntario (ruedas de actividad) permitió identificar cambios de expresión del factor de crecimiento vascular (*Vascular Growth Factor*, VGF), un factor neurotrófico que podría constituir una nueva diana terapéutica para el desarrollo de fármacos antidepresivos (28). Varios estudios han demostrado que en ratas y ratones jóvenes adultos, el ejercicio físico en ruedas de actividad influencia la transcripción génica en hipocampo (28, 39). Para investigar este aspecto en animales envejecidos, se estudió la capacidad de aprendizaje en el laberinto acuático en ratones que habían sido expuestos a un estilo de vida sedentario o a actividad física (corriendo en ruedas) durante los 16 meses previos. Luego del período de aprendizaje, se analizó la expresión de 24,000 genes en el hipocampo utilizando *microarrays*. Los ratones que provenían de un estilo de vida activo mostraron mayor activación de genes relacionados con neuroplasticidad y función mitocondrial, y disminución de expresión de genes asociados con estrés oxidativo y metabolismo lipídico (49). También existen algunos datos recientes indicando cambios de expresión génica en respuesta al ejercicio en humanos. Por ejemplo, se han identificado cambios en células sanguíneas periféricas en humanos en respuesta a un programa de ejercicio físico aeróbico (bicicleta ergométrica) de 1 hora de duración (ejercicio aeróbico) o hasta la máxima resistencia en tiempo (ejercicio exhaustivo). Dichos programas provocaron cambios de expresión en 21 y 16 genes, respectivamente, con un pico a las 4 horas. A las 24 horas de finalizado el ejercicio, el ejercicio exhaustivo pero no el aeróbico provocó alteración de expresión en 14 genes de los cuales 5 fueron receptores de neurotransmisores, entre ellos el receptor de 5-HT_{1A} y dos componentes del receptor GABA (30).

Los estudios comentados sugieren que el ejercicio físico podría tener efectos fisiológicos y cognitivos positivos a través de cambios del perfil transcripcional, aunque los mecanismos moleculares responsables de este efecto son aún poco conocidos (27, 49). En los últimos 3 años, unos pocos estudios han comenzado a analizar el impacto epigenético del ejercicio físico. Por ejemplo, se ha descrito que la exposición de roedores a un ambiente enriquecido que incluye ejercicio voluntario, aumenta la integridad sináptica y la neuroplasticidad cerebral y provoca mejoras en memoria, aprendizaje y respuesta al estrés. Estos efectos se han correlacionado con cambios epigenéticos en el hipocampo y zonas de la corteza cerebral, en tan sólo 3 horas y con una persistencia de al menos dos semanas. Se ha detectado que el ejercicio físico induce modificaciones en histonas en músculo esquelético humano (37) y provoca cambios epigenéticos en cerebro de ratones que correlacionan con mejoras cognitivas y mayor resistencia al estrés (16).

SIRTUINAS: ¿DIANAS DEL EJERCICIO FÍSICO?

La familia de las sirtuinas está altamente conservada, y se postula su papel clave en la supervivencia celular (42). Se describieron primero en levaduras (Sir2) y se han descrito hasta 7 homólogos humanos para la Sir2 (Sirt1 a Sirt7). De estas siete proteínas, se conoce que tres de ellas (Sirt1, Sirt6, y Sirt7) son nucleares, en concreto Sirt6 y Sirt7 están asociadas a la región heterocromática y al nucléolo, donde actúa la Sir2 en levaduras; la Sirt3, Sirt4 y Sirt5 se localizan en la mitocondria, orgánulo relacionado con el envejecimiento y el metabolismo. El sustrato principal para la Sirt1 *in vivo* e *in vitro*, pero no para las otras seis, es la p53 (38). La actividad desacetilasa y ADP ribosilasa dependiente de las sirtuinas, sugiere que estas pueden actuar como sensores del estado metabólico y oxidativo de las células regulando las funciones celulares de acuerdo a esta información. La Sirt1 en mamíferos se encuentra en el núcleo regulando por desacetilación a p53, NF- κ B y otros factores de transcripción (Figura 1). La Sirt2, es una proteína citoplasmática, que colocaliza con los microtúbulos y desacetila tubulina. Su expresión se incrementa durante la mitosis, lo cual sugiere un papel de esta proteína en el ciclo celular. Sirt 3, por ejemplo, modula la actividad mitocondrial reduciendo la producción de especies reactivas de oxígeno, implicando a nivel cerebral un papel neuroprotector claro. Por

lo tanto, las sirtuinas, participan en numerosas funciones importantes para la célula, incluyendo supervivencia y regulación de ciclo celular, e induciendo un incremento en la esperanza de vida (19, 24).

El estudio de las sirtuinas y su papel en la senescencia en humanos es un campo con amplias posibilidades. El papel protector de las sirtuinas está muy documentado en organismos inferiores, como levaduras, gusanos, moscas y roedores. Tanto la Sir2 como las sirtuinas de mamíferos experimentan un aumento en su expresión (*up-regulation*) cuando se somete al organismo a una restricción calórica o a un tratamiento con resveratrol, sustancia antioxidante de origen natural (9, 29). Actualmente se están realizando diversos estudios sobre nuevas moléculas que pueden modular la actividad sirtuina y que ofrecen un horizonte para aumentar la longevidad sana (35). El mecanismo global parece asociar la presencia de los polifenoles a las dietas con restricción calórica, con lo que se desencadenaría, a través de las sirtuinas, el proceso de activación en cascada, hasta Sir2 en el caso de las levaduras o Sirt1 en el de las células humanas, con el resultado de la prolongación de la vida de los individuos estudiados.

Asimismo, actualmente se están realizando estudios para determinar el impacto del ejercicio físico sobre la expresión y la actividad de las sirtuinas. Diversos hallazgos ilustran la interdependencia de los procesos metabólicos con la plasticidad sináptica durante el ejercicio físico. La dependencia de la actividad de las sirtuinas del NAD⁺, indica que ésta es dependiente de la función metabólica. Se han realizado diferentes estudios para evaluar el efecto del ejercicio voluntario en el patrón de expresión y modificación post-traducciona l de varias clases de proteínas en el hipocampo de rata (20, 21). Se determinó que aproximadamente el 90% de las proteínas identificadas se asocian al metabolismo de la energía y plasticidad sináptica. El hecho de que la mayoría de estas proteínas se encontraron incrementadas apoya la teoría de que el ejercicio induce cambios que benefician la salud a través de modificaciones en el uso de la energía e incrementos del metabolismo. Se ha descrito que en el hipocampo, el ejercicio voluntario oxidativo disminuye el estrés y aumenta los niveles de citocromo c oxidasa-II, un componente específico de la maquinaria mitocondrial (57). El ejercicio también aumenta significativamente la expresión de la proteína mitocondrial UCP2 (32, 34). Se ha sugerido que la capacidad de UCP2

para disminuir radicales libres de oxígeno, generar ATP y regular los niveles de calcio puede contribuir a la capacidad de las mitocondrias para modular función sináptica y la expresión génica. Resulta muy interesante el hecho de que las UCPs están reguladas por Sirt1 (Figura 2). Se ha determinado que el ejercicio incrementa la expresión de sirtuina 1 así como de PPAR-gamma (elemento relacionado con la movilización de tejido graso) en músculo esquelético (51). Este receptor está regulado por el factor de transcripción PGC1alfa, modulado asimismo por acetilación mediante Sirt1, y que se ha demostrado que aumenta su expresión génica y proteica en el ejercicio en animales y humanos (6, 51) reforzando la posibilidad de que parte de los efectos beneficiosos del ejercicio en la función de diferentes tejidos sean debidos a la modificación de la actividad de Sirt1 (Figura 2).

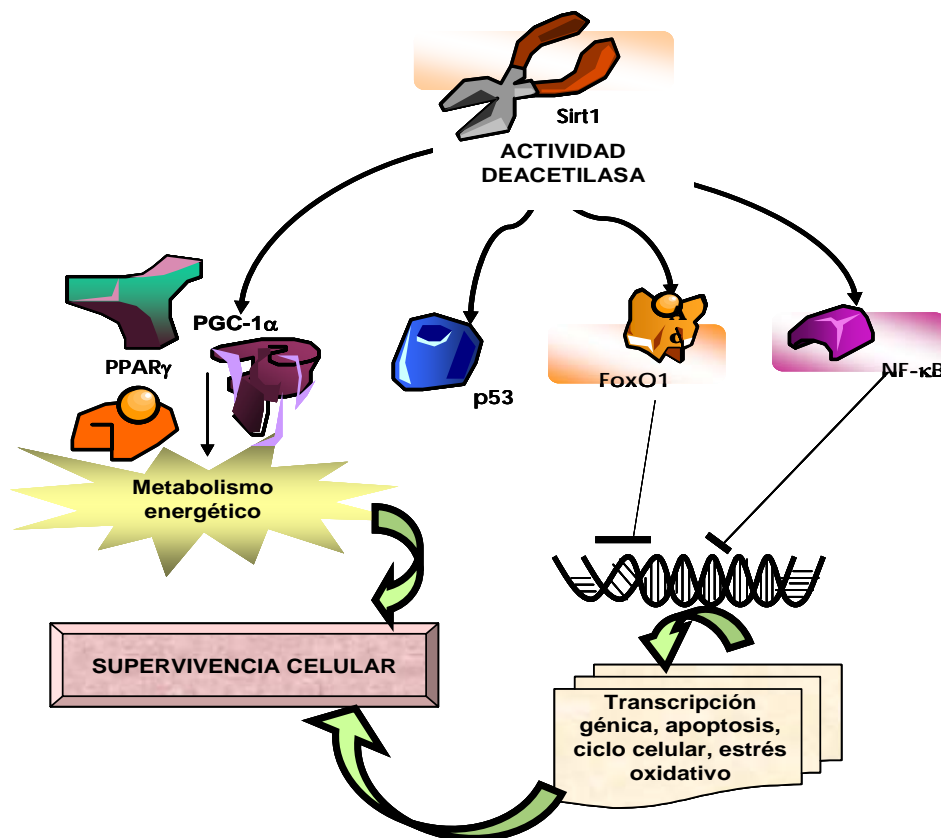


Figura 2. Esquema de los posibles mecanismos celulares implicados en los efectos benéficos del ejercicio sobre el envejecimiento, a través de Sirt1, que pueden además coincidir con los efectos de la restricción calórica y el resveratrol.

En resumen, el ejercicio y la dieta están asociados con el metabolismo energético en todos los sistemas corporales (especialmente en tejidos cardiovascular, muscular y adiposo) además del sistema nervioso. Ya que las sirtuinas son una familia de

proteínas ubicuas cuya actividad depende en parte de la homeóstasis metabólica, es posible que la mejora funcional que se ha descrito en diferentes sistemas tras la práctica del ejercicio voluntario, de forma análoga a la que se ha observado con el control de la ingesta calórica, este intrínsecamente relacionada con la modulación en la expresión y actividad de Sirt1.

Agradecimientos

El trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (DPS2008-06998-C02).

REFERENCIAS

1. Ahmadi, S., Sinclair, P. J., and Davis, G. M. (2008) Muscle oxygenation after downhill walking-induced muscle damage, *Clin. Physiol Funct. Imaging* 28, 55-63.
2. Alaei, H., Borjeian, L., Azizi, M., Orian, S., Pourshanazari, A., and Hanninen, O. (2006) Treadmill running reverses retention deficit induced by morphine, *Eur. J. Pharmacol.* 536, 138-141.
3. Albeck, D. S., Sano, K., Prewitt, G. E., and Dalton, L. (2006) Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat, *Behav. Brain Res.* 168, 345-348.
4. Ang, E. T., Dawe, G. S., Wong, P. T., Moochhala, S., and Ng, Y. K. (2006) Alterations in spatial learning and memory after forced exercise, *Brain Res.* 1113, 186-193.
5. Anshel, M. H. (1996) Effect of chronic aerobic exercise and progressive relaxation on motor performance and affect following acute stress, *Behav. Med.* 21, 186-196.
6. Baar, K., Wende, A. R., Jones, T. E., Marison, M., Nolte, L. A., Chen, M., Kelly, D. P., and Holloszy, J. O. (2002) Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1, *FASEB J* 16, 1879-1886.
7. Blauw, G. J., Shepherd, J., and Murphy, M. B. (2001) Dementia and statins. PROSPER study group, *Lancet* 357, 881.
8. Blustein, J. E., McLaughlin, M., and Hoffman, J. R. (2006) Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats, *Physiol Behav.* 89, 582-586.
9. Borra, M. T., Smith, B. C., and Denu, J. M. (2005) Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol, *J. Biol. Chem.* 280, 17187-17195.
10. Burghardt, P. R., Fulk, L. J., Hand, G. A., and Wilson, M. A. (2004) The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats, *Brain Res.* 1019, 84-96.
11. Burghardt, P. R., Pasumarthi, R. K., Wilson, M. A., and Fadel, J. (2006) Alterations in fear conditioning and amygdalar activation following chronic wheel running in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84, 306-312.
12. Bye, A., Hoydal, M. A., Catalucci, D., Langaas, M., Kemi, O. J., Beisvag, V., Koch, L. G., Britton, S. L., Ellingsen, O., and Wisloff, U. (2008) Gene expression profiling of skeletal muscle in exercise-trained and sedentary rats with inborn high and low VO₂max, *Physiol Genomics* 35, 213-221.
13. Carro, E., Trejo, J. L., Busiguina, S., and Torres-Aleman, I. (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy, *J. Neurosci* 21, 5678-5684.
14. Carter, C. S., Hofer, T., Seo, A. Y., and Leeuwenburgh, C. (2007) Molecular mechanisms of life- and health-span extension: role of calorie restriction and exercise intervention, *Appl. Physiol Nutr. Metab* 32, 954-966.
15. Colcombe, S. J., Kramer, A. F., McAuley, E., Erickson, K. I., and Scalf, P. (2004) Neurocognitive aging and cardiovascular fitness: recent findings and future directions, *J. Mol. Neurosci* 24, 9-14.
16. Collins, A., Hill, L. E., Chandramohan, Y., Whitcomb, D., Droste, S. K., and Reul, J. M. (2009) Exercise improves cognitive responses to psychological stress through enhancement of epigenetic mechanisms and gene expression in the dentate gyrus, *PLoS. One.* 4, e4330.

17. Cotman, C. W., Berchtold, N. C., and Christie, L. A. (2007) Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation, *Trends Neurosci* 30, 464-472.
18. Crepaldi, L. and Riccio, A. (2009) Chromatin learns to behave, *Epigenetics*. 4, 23-26.
19. Denu, J. M. (2003) Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases, *Trends Biochem. Sci.* 28, 41-48.
20. Ding, Q., Vaynman, S., Souda, P., Whitelegge, J. P., and Gomez-Pinilla, F. (2006) Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis, *Eur. J. Neurosci* 24, 1265-1276.
21. Ding, Y., Li, J., Lai, Q., Azam, S., Rafols, J. A., and Diaz, F. G. (2002) Functional improvement after motor training is correlated with synaptic plasticity in rat thalamus, *Neurol. Res.* 24, 829-836.
22. Garza, A. A., Ha, T. G., Garcia, C., Chen, M. J., and Russo-Neustadt, A. A. (2004) Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77, 209-220.
23. Gomez-Pinilla, F., So, V., and Kesslak, J. P. (1998) Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise, *Neuroscience* 85, 53-61.
24. Guarente, L. and Kenyon, C. (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms, *Nature* 408, 255-262.
25. HARMAN, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.* 11, 298-300.
26. Hayflick, L. (1968) Human cells and aging, *Sci. Am.* 218, 32-37.
27. Hillman, C. H., Snook, E. M., and Jerome, G. J. (2003) Acute cardiovascular exercise and executive control function, *Int. J. Psychophysiol.* 48, 307-314.
28. Hunsberger, J. G., Newton, S. S., Bennett, A. H., Duman, C. H., Russell, D. S., Salton, S. R., and Duman, R. S. (2007) Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF, *Nat Med.* 13, 1476-1482.
29. Kaeberlein, M., Kirkland, K. T., Fields, S., and Kennedy, B. K. (2005) Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background, *Mech. Ageing Dev.* 126, 491-504.
30. Kawai, T., Morita, K., Masuda, K., Nishida, K., Sekiyama, A., Teshima-Kondo, S., Nakaya, Y., Ohta, M., Saito, T., and Rokutan, K. (2007) Physical exercise-associated gene expression signatures in peripheral blood, *Clin. J. Sport Med.* 17, 375-383.
31. Kim, Y. P., Kim, H., Shin, M. S., Chang, H. K., Jang, M. H., Shin, M. C., Lee, S. J., Lee, H. H., Yoon, J. H., Jeong, I. G., and Kim, C. J. (2004) Age-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats, *Neurosci Lett.* 355, 152-154.
32. Kramer, A. F., Erickson, K. I., and Colcombe, S. J. (2006) Exercise, cognition, and the aging brain, *J. Appl. Physiol* 101, 1237-1242.
33. Larson, E. B., Wang, L., Bowen, J. D., McCormick, W. C., Teri, L., Crane, P., and Kukull, W. (2006) Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older, *Ann. Intern. Med.* 144, 73-81.
34. Laurin, D., Verreault, R., Lindsay, J., MacPherson, K., and Rockwood, K. (2001) Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons, *Arch. Neurol.* 58, 498-504.
35. Mai, A., Massa, S., Lavu, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Ragno, R., Mariotti, F. R., Chiani, F., Camilloni, G., and Sinclair, D. A. (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors, *J. Med. Chem.* 48, 7789-7795.
36. Mattson, M. P. and Magnus, T. (2006) Ageing and neuronal vulnerability, *Nat Rev. Neurosci* 7, 278-294.
37. McGee, S. L., Fairlie, E., Garnham, A. P., and Hargreaves, M. (2009) Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle, *J. Physiol* 587, 5951-5958.
38. Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C., and Horikawa, I. (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins, *Mol. Biol. Cell* 16, 4623-4635.
39. Molteni, R., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2002) Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray, *Eur. J. Neurosci* 16, 1107-1116.
40. Narath, E., Skalicky, M., and Viidik, A. (2001) Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently, *Exp. Gerontol.* 36, 1699-1711.
41. O'Brien, M. (1996) Osteoporosis and exercise, *Br. J. Sports Med.* 30, 191.
42. Pallas, M., Verdaguer, E., Tajés, M., Gutierrez-Cuesta, J., and Camins, A. (2008) Modulation of sirtuins: new targets for antiageing, *Recent Patents. CNS. Drug Discov.* 3, 61-69.

43. Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W., and Goto, S. (2008) Exercise, oxidative stress and hormesis, *Ageing Res. Rev.* 7, 34-42.
44. Radak, Z., Taylor, A. W., Ohno, H., and Goto, S. (2001) Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain, *Exerc. Immunol. Rev.* 7, 90-107.
45. Roos, M. R., Rice, C. L., and Vandervoort, A. A. (1997) Age-related changes in motor unit function, *Muscle Nerve* 20, 679-690.
46. Rovio, S., Kareholt, I., Helkala, E. L., Viitanen, M., Winblad, B., Tuomilehto, J., Soininen, H., Nissinen, A., and Kivipelto, M. (2005) Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease, *Lancet Neurol.* 4, 705-711.
47. Siegmund, K. D., Connor, C. M., Campan, M., Long, T. I., Weisenberger, D. J., Biniszkiwicz, D., Jaenisch, R., Laird, P. W., and Akbarian, S. (2007) DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons, *PLoS. One.* 2, e895.
48. Simon, E. L., Gaughan, E. M., Epp, T., and Spire, M. (2006) Influence of exercise on thermographically determined surface temperatures of thoracic and pelvic limbs in horses, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 1940-1944.
49. Stranahan, A. M., Lee, K., Becker, K. G., Zhang, Y., Maudsley, S., Martin, B., Cutler, R. G., and Mattson, M. P. (2008) Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of memory by running in aged mice, *Neurobiol. Aging.*
50. Strasser, A., Skalicky, M., Hansalik, M., and Viidik, A. (2006) The impact of environment in comparison with moderate physical exercise and dietary restriction on BDNF in the cerebral parietotemporal cortex of aged Sprague-Dawley rats, *Gerontology* 52, 377-381.
51. Suwa, M., Nakano, H., Radak, Z., and Kumagai, S. (2008) Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle, *Metabolism* 57, 986-998.
52. Tra, J., Kondo, T., Lu, Q., Kuick, R., Hanash, S., and Richardson, B. (2002) Infrequent occurrence of age-dependent changes in CpG island methylation as detected by restriction landmark genome scanning, *Mech. Ageing Dev.* 123, 1487-1503.
53. Trejo, J. L., Llorens-Martin, M. V., and Torres-Aleman, I. (2008) The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis, *Mol. Cell Neurosci* 37, 402-411.
54. Uysal, N., Tugyan, K., Kayatekin, B. M., Acikgoz, O., Bagriyanik, H. A., Gonenc, S., Ozdemir, D., Aksu, I., Topcu, A., and Semin, I. (2005) The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory, *Neurosci Lett.* 383, 241-245.
55. van, P. H., Kempermann, G., and Gage, F. H. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus, *Nat Neurosci* 2, 266-270.
56. van, P. H., Shubert, T., Zhao, C., and Gage, F. H. (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice, *J. Neurosci* 25, 8680-8685.
57. Vaynman, S., Ying, Z., Wu, A., and Gomez-Pinilla, F. (2006) Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity, *Neuroscience* 139, 1221-1234.
58. Vina, J., Borras, C., and Miquel, J. (2007) Theories of ageing, *IUBMB. Life* 59, 249-254.
59. Virtanen, C. and Takahashi, M. (2008) Muscling in on microarrays, *Appl. Physiol Nutr. Metab* 33, 124-129.
60. Wareham, K. A., Lyon, M. F., Glenister, P. H., and Williams, E. D. (1987) Age related reactivation of an X-linked gene, *Nature* 327, 725-727.
61. Wilson, V. L., Smith, R. A., Ma, S., and Cutler, R. G. (1987) Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age, *J. Biol. Chem.* 262, 9948-9951.
62. Wolozin, B. (2002) Cholesterol and Alzheimer's disease, *Biochem. Soc. Trans.* 30, 525-529.
63. Yaffe, K. (2007) Metabolic syndrome and cognitive decline, *Curr. Alzheimer Res.* 4, 123-126.
64. Yaffe, K., Kanaya, A., Lindquist, K., Simonsick, E. M., Harris, T., Shorr, R. I., Tylavsky, F. A., and Newman, A. B. (2004) The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline, *JAMA* 292, 2237-2242.

INSIGHTS SOBRE EPILEPSIA E EXERCÍCIO FÍSICO

¹Arida RM, ²Cavalheiro EA, ²Calderazzo L, ²Scorza FA.

¹Departamento de Fisiologia, y ²Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Disciplina de Neurologia Experimental, Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina. São Paulo. Brazil.

ASPECTOS GERAIS SOBRE EPILEPSIA

A epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns no mundo. Nos países desenvolvidos, a incidência da epilepsia é de cerca de 50 por 100.000 pessoas por ano, sendo maior em crianças e idosos (Duncan et al., 2006). Estudos epidemiológicos sugerem que entre 70 e 80% das pessoas que desenvolvem epilepsia entram em remissão, enquanto os demais continuam a apresentar crises e são refratários ao tratamento medicamentoso (Sander, 1993; Kwan e Sander, 2004). Os fatores de risco mais comuns para a epilepsia são as doenças cerebrovasculares, tumores cerebrais, álcool, lesões traumáticas de cabeça, malformações do desenvolvimento cortical, herança genética e infecções do sistema nervoso central (Halatchev, 2000). Nos países em desenvolvimento, infecções endêmicas, como malária e neurocisticercose parecem ser importantes fatores de risco (Duncan et al., 2006). Além disso, a epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia parcial, afetando pelo menos de 40% de todas as pessoas com epilepsia (Babb, 1999) e é a forma mais comum de epilepsia refratária ao tratamento farmacológico (Engel, 1993). Indivíduos com ELT geralmente apresentam descrição clínica similar, incluindo uma lesão precipitante inicial referido como estado de mal epiléptico (SE), traumatismo craniano, encefalite ou convulsões febris na infância (Fisher et al., 1998; Cendes, 2002). Geralmente, existe um período latente de vários anos entre a lesão e o aparecimento da TLE crônica caracterizada por crises espontâneas e recorrentes (Devinsky, 2004; Detour et al., 2005).

Clinicamente, as epilepsias caracterizam-se por crises epiléticas espontâneas e recorrentes que são causadas por descargas paroxísticas parciais (focais) ou generalizadas no cérebro. As crises epiléticas são manifestações de descargas anormais hipersincrônicas dos neurônios corticais. Os sinais ou sintomas clínicos das crises dependem da localização, da extensão e do padrão de propagação das descargas epiléticas no cérebro (Dichter, 1994).

Crises e epilepsias são divididas em dois grupos: parciais e generalizadas. As crises parciais ou focais apresentam evidências clínicas ou eletroencefalograma (EEG) de início local, geralmente em uma região de um hemisfério, que pode se espalhar para outras partes do cérebro durante a crise. As crises generalizadas essencialmente começam simultaneamente em ambos os hemisférios cerebrais. As crises parciais são subclassificados em três grupos: crises parciais simples, crises parciais complexas e crises parciais secundariamente generalizando para clônicas e/ou crises tônicas. As crises parciais simples estão associadas com a preservação da consciência e geralmente com o envolvimento de hemisfério unilateral. As crises parciais complexas estão associadas com a alteração ou perda da consciência e geralmente com o envolvimento dos dois hemisférios. Uma crise parcial pode progredir para generalização secundária, isto é, uma crise convulsiva generalizada tônico-clônica que procede de uma crise parcial simples ou crise parcial complexa. As crises generalizadas são subclassificadas principalmente pela presença ou diferentes padrões de movimentos motores (Loscher, 1997; Chang e Lowenstein, 2003). As crises generalizadas compreendem: a- crises generalizadas tônico-clônicas (grande mal), b- crises de ausência (pequeno mal), c- crises mioclônicas, d- crises atônicas, e- crise clônicas e f- crises tônicas.

Devido aos avanços tecnológicos na área da epileptologia e o aperfeiçoamento das técnicas de imagem (ressonância magnética, vídeo-eletroencefalografia), o Comitê Executivo da ILAE publicou uma nova proposta para a classificação das crises epiléticas (ENGEL JR., 2001), que passou a ser considerada como uma entidade diagnóstica. A classificação proposta pela ILAE 2001 (Engel 2001): Crises isoladas ou auto-limitadas (crises focais ou complexas). Crises contínuas (status epilepticus focal ou generalizado). Crises reflexas (desencadeadas por fatores precipitantes que podem gerar crises focais ou generalizadas).

De acordo com a classificação descrita, a etiologia das síndromes epiléticas pode ser dividida em 4 grupos (Commission, 1981, 1989; Sander, 2005): Epilepsia idiopática - geralmente não está associada a características clínicas particulares e a achados eletrencefalográficos (EEG) específicos, além de ser geneticamente determinada. Epilepsia criptogênica - refere-se a crises cujas causas são desconhecidas ou difíceis de serem determinadas. Epilepsia sintomática - é aquela em que é possível determinar uma lesão estrutural epileptogênica. Epilepsia progressiva - quando está associada a alguma condição neurológica evolutiva.

EPILEPSIA E EXERCÍCIO FÍSICO

Estudos em humanos

Embora o efeito benéfico do exercício físico na saúde em geral está bem documentado, pessoas com epilepsia são muitas vezes excluídas da participação de atividades físicas ou esportivas. Isso é surpreendente porque para muitas pessoas com doenças de alto risco, como aqueles com doenças coronárias e diabetes, o exercício físico tem fornecido efeitos benéficos. Esta relutância de ambos os pacientes e profissionais da área de saúde é devido ao medo que a fadiga resultante do exercício possa precipitar mais crises ou predispor a lesões (Bjorholt et al., 1990). A decisão na indicação de pessoas com epilepsia para programas de exercícios físicos, de lazer ou esporte competitivo, especialmente esportes de colisão ou de contato, tem sido questionada por muitos anos. Historicamente, a atividade física regular tem sido considerada por muito tempo benéfica para os as crises epiléticas. O epileptologista WG Lennox já relatava que "a atividade física e mental parece ser um antagonista das crises" (Lennox, 1960). A atitude em relação à restrição e proteção das pessoas com epilepsia tem mudado radicalmente nas últimas décadas e recomendações gerais foram recentemente revisadas. Por exemplo, em 1968, a Associação Médica Americana informou que as pessoas com epilepsia não controlada farmacologicamente deveriam evitar não só os esportes de contato, mas também os esportes sem contato direto (American Medical Association Committee on the Medical Aspects of Sports: Convulsive disorders and participation in sports and physical education, 1968; American Academy of Pediatrics Committee on Children with Handicaps: The epileptic child and competitive school athletics, 1968).

Em 1974, a Comissão revisou esta ocorrência, sugerindo que pessoas com crises controladas deveriam ser autorizadas a praticar qualquer esporte, exceto as atividades com possível ocorrência de traumatismo de cabeça (American Medical Association Committee on the Medical Aspects of Sports: Epileptics and contact sports, 1974). Em 1983, a Academia Americana de Pediatria permitiu considerações individuais e relatou: "a epilepsia, per se, não deve excluir uma criança de atividades esportivas como hóquei, futebol, basquete e luta" (American Academy of Pediatrics Committee on Children with Handicaps and Committee on Sports Medicine: Sports and the child with epilepsy, 1983). Em 1997, a Liga Internacional contra a Epilepsia proibiu recomendou a proibição do pára-quedismo e mergulho (Commission of Pediatrics of the International League Against Epilepsy: Restrictions for children with epilepsy, 1997).

Para podermos indicar atividades esportivas adequadas é essencial entender os fatores que podem afetar a epilepsia durante as atividades esportivas. Em geral, a literatura atual sugere que uma vez que as crises estejam bem controladas, o indivíduo deve levar uma vida ativa e participar de esportes e outras atividades físicas.

Os trabalhos desenvolvidos para verificar a relação entre epilepsia e exercício, comparam atividades físicas e sociais entre as pessoas com epilepsia com base em questionários e/ou ensaios clínicos (Roth et al., 1994; Steinhoff et al., 1996), bem como avaliam a aptidão física por meio de testes padronizados de exercício físico (Steinhoff et al., 1996; Jalava e Sillanpaa, 1997). Curiosamente, poucos estudos em humanos têm analisado o efeito de um programa de exercício aeróbico em pessoas com epilepsia. Por exemplo, um estudo realizado por Nakken e colaboradores mostrou que quatro semanas de treinamento físico a 60% do VO_2 max, 45 min por dia, não alterou a frequência média de crises do grupo estudado (Nakken et al., 1990). Um programa de exercício físico aeróbico em mulheres com epilepsia refratária diminuiu o número de crises epilépticas durante o período de treinamento (Eriksen et al., 1994). Um estudo posterior não mostrou impacto negativo da frequência de crises após 12 semanas de exercícios físicos (McAuley et al., 2001).

Outro ponto importante a ser considerado é o baixo grau de participação de atividades físicas entre as pessoas com epilepsia (Denio et al., 1989; Nakken et al.,

1999; Roth et al., 1994). Um estudo na Noruega mostrou que apenas 23% participaram de atividade física orientada (Bjorholt et al., 1990). Apesar dos achados de vários estudos epidemiológicos, estes dados não podem ser diretamente aplicáveis aos países em desenvolvimento. Um estudo conduzido por Arida e colaboradores (2003), analisou o grau de participação em atividades físicas entre os brasileiros com epilepsia. Embora somente 15 por cento dos pacientes foram classificados como fisicamente ativos, ou seja, realizavam exercício físico regularmente, mais de metade dos indivíduos participavam de atividades físicas, uma vez ou duas vezes por semana ou nos finais de semana. Outros fatores como a falta de informação, problemas de transporte, baixa motivação, medicação e a falta de instrutores qualificados têm sido observados como importantes fatores que justificam uma baixa participação em atividades físicas ou esportivas (Bjorholt et al., 1990).

Riscos de participação de atividades esportivas

Estudos têm analisado a magnitude do risco de certas atividades para as pessoas com epilepsia. A opinião geral é que estes riscos são determinados pela ocorrência de crise epiléptica durante a participação esportiva. O risco de lesões devido a uma queda brusca tem sido abordado em alguns estudos. Neste sentido, Aisenson (1948) constatou que durante um período de 16 anos, crianças com epilepsia não apresentavam grande risco de lesões durante as atividades diárias do que as crianças que nunca tinham tido uma crise epiléptica. No entanto, como durante uma crise existe um grande risco de queda, alguns esportes devem ser evitados por pessoas que apresentam crises epilépticas freqüentes.

Realmente, as crises podem ser prejudiciais durante certas atividades esportivas. Tem sido também analisado o risco da prática de esportes aquáticos devido à possibilidade de afogamento induzidas pelas crises. Pearn e colaboradores (1978) constataram que quatro de 140 acidentes de atividades aquáticas foram causadas por crises ao longo de um período de cinco anos no Havaí. Eles relataram que nenhuma criança morreu e que a taxa de acidentes foi semelhante à da população em geral. Por outro lado, Kemp e Sibert (1993) identificaram quatro crianças que se afogaram no Reino Unido em um período de apenas um ano. De forma geral, os esportes aquáticos são permitidos com precauções necessárias. Este risco pode ser

ainda mais reduzido quando realizada com supervisão direta. Em relação os esportes de contato, não existem evidências de que o trauma leve repetitivo cabeça possa piorar a frequência e/ou gravidade da epilepsia. Realmente, os esportes de contato, especialmente o futebol são atividades comuns para crianças e adolescentes, e desta forma sua proibição pode ter consequências importantes (Livingston e Berman, 1973). Alguns esportes de contato têm sido contra-indicados para pessoas com epilepsia. No entanto, a lesão de cabeça repetida em esportes competitivos não demonstrou nenhuma associação consistente com epilepsia (Van Linschoten et al., 1990). Apesar do boxe ter sido um esporte contra-indicado para pessoas com epilepsia, um estudo não mostrou nenhuma alteração importante no EEG ou de neuroimagem em 47 suecos pugilistas amadores, quando comparados com jogadores de futebol (Haglung e Bergstrand, 1990). Neste sentido, não existem evidências epidemiológicas de que a epilepsia provoca lesão de cabeça. Esta associação tem sido significativa apenas para trauma grave de cabeça (Annegers et al., 1998). As informações acima sugerem que o risco de esportes de contato na epilepsia é mínimo e não é suficientemente significativo para justificar restrições de rotina. Portanto, é importante avaliar o risco-benefício na decisão de permitir uma pessoa com epilepsia na participação de atividades esportivas. O risco-benefício para uma pessoa com epilepsia depende da atividade esportiva considerada, do tipo de crise que possa ocorrer, bem como a probabilidade da ocorrência de crises durante os esportes praticados.

Possíveis ações do exercício na inibição das crises epiléticas

O mecanismo particular pelo qual o exercício físico induz uma proteção contra as crises epiléticas não está bem esclarecido. Entretanto algumas hipóteses são sugeridas. A acidez provocada pelo exercício pode agir como um mecanismo de proteção, aumentando o limiar para as crises (Götze et al., 1967). O exercício físico intenso aumenta os níveis de lactato sanguíneo provocando uma acidose metabólica. Sabe-se que a acidez reduz a irritabilidade do córtex (Gibbs et al., 1940). Enzimas que controlam a concentração do GABA no cérebro (transaminases e descarboxilase) parecem ser influenciadas por mudanças no pH. Como a acidose aumenta e a alcalose diminui a concentração de GABA, o exercício físico pode diminuir o pH do sangue, levando a alteração na eficácia das enzimas envolvidas no

metabolismo do GABA e resultando em um aumento da concentração de GABA no cérebro, que produz um efeito anticonvulsivante natural. Ainda, pesquisas sobre a atividade elétrica do cérebro mostram que as descargas anormais desaparecem durante a atividade física na maioria dos indivíduos, mas retornam em repouso (Götze et al., 1967; Kuijer, 1980). Cordova (1993) verificou que poucas crises ocorrem durante a atividade física e mental em comparação com períodos de repouso. Além disso, tem sido sugerido que durante o exercício, o estado de vigília e de alerta podem contribuir para diminuição da frequência das crises (Kuijer, 1980). Uma outra hipótese refere-se às β -endorfinas liberadas durante o exercício. As endorfinas produzidas durante o exercício podem funcionar como um anticonvulsivante natural, uma vez que as β -endorfinas tendem a inibir a atividade epileptiforme (Albrecht, 1986).

Possíveis ações do exercício na indução das crises epiléticas

Alguns fatores são colocados com possíveis indutores de crises epiléticas durante atividades físicas e/ou esportivas. Por exemplo, o stress físico e principalmente psicológico são geralmente aceitos como fatores que precipitam as crises (Temkin e Davis, 1984). No esporte competitivo esse estresse pode induzir crises em pessoas sensíveis ao stress (McLaurin, 1973; Cordova et al., 1993). A hipóxia, a hiperhidratação e a hipoglicemia são outros possíveis fatores. A hipóxia pode ocorrer durante os esportes em altitude (> 2000m) (Boucharlat et al., 1973; MacLaurin, 1973). A hiperhidratação provocada por uma grande ingestão de água ou de uma perda extrema de sódio (durante a natação ou o exercício físico prolongado, tais como maratona e triatlo) pode provocar convulsões. A ingestão excessiva de líquidos isotônicos ou hipotônicos pode levar a uma hiponatremia (Bennett e Wagner, 1983; Noakes et al., 1984). A hipoglicemia pode ocorrer durante a corrida de longa distância, ciclismo ou natação, especialmente quando ocorre uma redução de líquidos e de alimentos (French, 1983). A hipertermia também é conhecida por desencadear crises convulsivas. O exercício prolongado (maratona, triatlo) em altas temperaturas e sob condições úmidas também coloca as pessoas em risco (Millington, 1985; van Willigen, 1988). Um fator considerado com frequência como indutor de crises, mas de forma inadequada, é a hiperventilação. Uma vez que a hiperventilação no laboratório pode provocar descargas epileptiformes no EEG e

crises, em especial de ausência, alguns neurologistas acreditavam que a ventilação aumentada durante o exercício poderia causar crises epiléticas (Esquivel et al., 1991). No entanto, o aumento da ventilação durante o exercício físico é um mecanismo homeostático compensatório, isto é, a alcalose respiratória da hiperventilação induzida não ocorre durante o exercício (Wasserman e col. 1973).

Benefícios psicológicos do exercício físico na epilepsia

Pessoas com epilepsia apresentam uma considerável diminuição da aptidão física refletindo na sua saúde e qualidade de vida (Steinhoff et al., 1996). Vários fatores, como condições comportamentais, sociais, cognitivas, emocionais, capacidade de trabalho, estabilidade familiar, auto-estima, estigma são de grande importância para a qualidade de vida dos indivíduos com epilepsia (Devinsky, 1996; Kellett, et al., 1997). Estudos sugerem que a frequência de crises exerce um impacto significativo na qualidade de vida (Leidy, et al., 1999). Várias pesquisas também mostram um baixo grau de participação em atividades físicas entre as pessoas com epilepsia (Bjorholt, et al., 1990; Denio et al., 1989). A noção de que a atividade física pode provocar crises ou aumentar a propensão a lesões, representa um obstáculo para algumas pessoas com epilepsia que desejam levar uma vida ativa (Roth et al., 1994). Tem sido observado um grande número de pessoas que se sentem constrangidos após apresentar uma crise durante o exercício. Em geral, co-morbidades tais como depressão e estresse emocional são comuns em pessoas com epilepsia (Blumer et al., 1998). Neste sentido, o exercício físico regular tem recebido grande atenção como um mecanismo para aumentar a resistência aos efeitos negativos do stress psicossocial em indivíduos sem epilepsia. O exercício físico é geralmente aceito na contribuição para a saúde geral e bem-estar (Bouchard, 1990), mudanças positivas no estilo de vida (Shepard, 1990), melhora de humor, qualidade de vida (Folkins e Sime, 1981) e redução da ansiedade e sintomas depressivos (Martinsen et al., 1985), juntamente com aumento da capacidade de lidar com o stress (Steptoe et al., 1989). Estudos mostram que uma única sessão de exercício moderado pode trazer benefício agudo no estado de humor (Roth et al., 1989) e programas de exercícios reduzem a depressão (Griest et al., 1979). Por exemplo, foi observado que indivíduos que faziam atividade física regular apresentavam níveis significativamente mais baixos de depressão e uma melhor adaptação psicossocial

que indivíduos sedentários (Roth et al., 1994). Da mesma forma, Eriksen e colaboradores mostraram que um programa regular de exercício melhorou a qualidade de vida de mulheres com epilepsia de difícil controle (Eriksen et al., 1994). Subsequentemente, Roth e colaboradores (1994) constataram que a frequência de crises estava positivamente correlacionada com a depressão. Considerando os vários efeitos psicológicos da prática regular do exercício físico, a atividade física poderia influenciar de forma positiva na qualidade de vida das pessoas com epilepsia.

Drogas antiepilépticas e exercício físico

Os efeitos colaterais de várias drogas antiepilépticas (DAE) como fadiga, dificuldade de concentração, piora da coordenação e sonolência podem influenciar o desempenho físico das pessoas com epilepsia ou contribuir para a diminuição do estímulo da prática esportiva. Neste sentido, algumas questões são frequentemente levantadas como: O exercício pode afetar o metabolismo, a absorção e a concentração sérica das DAE? Quais são os efeitos adversos das DAE? Como as DAE afetam o desempenho físico?

Estudos mostram que o treinamento físico tem um efeito no aumento da indução de enzimas hepáticas (Frenkl et al., 1980). No entanto, não está bem determinado se o exercício físico regular afeta os níveis séricos de determinadas AEDs (Nakken et al., 1990; Eriksen et al., 1994). Portanto, existe o receio de que o exercício possa alterar o metabolismo das AED, reduzindo a concentração sérica AED e resultar em crises epiléticas. Desta forma, os níveis séricos das AED em pessoas que participam em programas regulares de exercícios devem ser cuidadosamente monitorizados, especialmente nos primeiros meses do exercício físico. Um dos poucos estudos que verificam este tópico mostrou que um programa de exercício aeróbio de quatro semanas não alterou significativamente os níveis das AED (Nakken et al., 1990). Vale a pena ressaltar que não existem dados na literatura mostrando uma relação entre DAE e performance física. Portanto, uma vez que há necessidade de informações mais consistentes a esse respeito, os níveis séricos das enzimas hepáticas devem ser cuidadosamente observados em pessoas que praticam exercício físico de forma regular.

Morbidade e Mortalidade na epilepsia

Estudos sugerem que pessoas com epilepsia apresentam maiores comorbidades como distúrbios psiquiátricos e de morrer prematuramente. É importante salientar que a mortalidade na epilepsia é de duas a três vezes maiores em pessoas com epilepsia em comparação com a população geral (Cockerell et al., 1994; Hauser et al., 1980; Tomson et al., 2005). Morte súbita inesperada em epilepsia (SUDEP) é definida como um óbito de ocorrência não traumática, sem afogamento, pode ter ou não relatos de crise, excetuando-se status epilepticus, e os exames realizados após a morte não podem revelar causas anatômicas ou toxicológicas para a morte (Nashef, 1997).

Informações sobre fatores de risco para SUDEP são conflitantes, mas alguns fatores de risco incluem idade de início precoce da epilepsia, a duração da epilepsia, epilepsia de difícil controle, a frequência de crises, tipo de crises e número de drogas antiepilépticas (Stollberger e Finsterer, 2004). As causas fisiopatológicas exatas da SUDEP são desconhecidas, mas é muito provável que a arritmia cardíaca durante e entre as crises tem um papel em potencial (Stollberger e Finsterer, 2004).

Outras medidas preventivas, não médicas e cirúrgicas podem ser úteis na prevenção da SUDEP (Scorza et al., 2008). Dentre elas, a atividade física pode desempenhar um papel determinante (Scorza et al., 2008; Arida et al., 2008a/b). Evidências de estudos clínicos e de animais indicam que a atividade física reduz a frequência de crises, bem como induz a uma melhora da saúde cardiovascular e psicológica em pessoas com epilepsia (Arida et al., 2008a), ver subtópico abaixo.

É importante ressaltar que o risco de morte não parece ser maior durante as atividades físicas e/ou esportivas (Arida et al., 2008b). Em vista da discussão acima, faltam informações não apenas para reforçar os resultados benéficos do exercício na redução das crises epiléticas, mas também para entender os mecanismos pelo qual o exercício protege o cérebro epilético. Nesse sentido, estudos em animais foram realizados para esta finalidade.

ESTUDOS EM MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIA

Modelos animais de epilepsia têm desempenhado um papel fundamental para a compreensão das alterações fisiológicas e comportamentais associadas com a

epilepsia humana. Eles nos permitem determinar a natureza das lesões que poderiam contribuir para o desenvolvimento da epilepsia, observar e intervir no processo anterior ao aparecimento de crises espontâneas assim como estudar o cérebro cronicamente epilético, utilizando técnicas fisiológicas, farmacológicas, moleculares e anatômicas. Como descrito acima, epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia parcial. Os modelos animais constituem uma das ferramentas mais valiosas para compreender melhor a fisiopatologia da ELT. Entre os vários modelos animais de ELT, vamos nos concentrar em dois modelos específicos de epileptogênese que foram usadas para compreender os mecanismos pelo qual o exercício físico interfere nas epilepsias: o modelo do kindling e o modelo da pilocarpina.

Estudos experimentais também têm demonstrado um efeito benéfico do exercício físico em animais com epilepsia (Arida et al., 1998/1999/2003/2004/2007). O primeiro estudo que relaciona o efeito do exercício físico na epilepsia utilizou o modelo de kindling (Arida et al., 1998). O termo Kindling refere-se ao fenômeno por meio do qual a administração repetida de um estímulo elétrico (ou químico), de baixa intensidade, com certa duração e determinada frequência, aplicado após determinado intervalo de tempo, em diversas estruturas do cérebro, provocam alterações progressivas eletrográficas e comportamentais culminando em crises generalizadas. Este fenômeno foi descrito por Graham Goddard (1967), sendo a metodologia, apresentada dois anos mais tarde por Goddard e col. (1969).

Os trabalhos originais de Goddard eram realizados através de estimulações elétricas focais em diferentes estruturas cerebrais. Nas primeiras estimulações, as manifestações eletrencefalográficas são inicialmente breves (alguns segundos de duração) e de caráter focal, aumentando progressivamente com a repetição dos estímulos nos dias subsequentes. Com o desenvolvimento do processo do kindling, estas descargas tornam-se mais prolongadas e ocorre difusão para as diversas estruturas cerebrais. Do ponto de vista comportamental, os animais apresentam alterações comportamentais progressivas. Racine (1972) descreveu uma escala da evolução comportamental no abrasamento amigdaliano segundo 5 estádios distintos: Estádio 1 - o animal fica parado, apresenta comportamento de orientação, pisca o olho do lado estimulado e apresenta movimentos orofaciais. Estádio 2 -

estadio 1 acrescido de clonias faciais bilaterais, movimentos mastigatórios, com ou sem salivação. Estadio 3 - estadio 2 acrescido de clonias dos membros anteriores. Estadio 4 - estadio 3 acrescido de "rearing" (o animal fica em pé, apresentando clonias de ambas as patas anteriores e apoiando-se sobre as patas posteriores). Estadio 5 - estadio 4 seguido de perda de equilíbrio e queda (convulsões generalizadas).

Para avaliar o efeito do exercício sobre a evolução do kindling, os animais foram submetidos a uma sessão diária de exercícios aeróbicos, que consistiu de 40 minutos de corrida em esteira a 20 metros por minuto durante 45 dias. Após este período de treinamento, eles foram submetidos a 40 min de corrida na mesma velocidade e estimulados eletricamente um minuto pós-exercício. Foi necessário um número maior de estímulos para o grupo treinado para atingir o estágio cinco quando comparado com o grupo controle. Alguns fatores poderiam provavelmente estar contribuindo para este efeito. Varias pesquisas têm mostrado que a neurotransmissão do cérebro é influenciado pelo exercício. Por exemplo, um aumento dos níveis de noradrenalina no cérebro tem sido relatado (Brown e Van Huss, 1973; De Castro e Duncan, 1985). É conhecido que entre catecolaminas, a noradrenalina tem um efeito inibitório tônico sobre o desenvolvimento do kindling, mas não depois do estabelecimento do kindling (Westerberg, 1984). Dados que evidenciam mudanças na síntese e metabolismo de catecolaminas durante o exercício e o envolvimento inibitório deste neurotransmissor no desenvolvimento do kindling da amígdala suporta a hipótese que o efeito do exercício crônico sobre as catecolaminas podem contribuir para retardar o desenvolvimento do kindling.

Um estudo subsequente, utilizando o modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina, avaliou o efeito de um programa de exercício físico na frequência de crises (Arida et al., 1999). O modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina reproduz as principais características da ELT humana em ratos e camundongos. A administração sistêmica de pilocarpina (um agonista colinérgico muscarínico), em ratos e camundongos, numa dose de 350 a 380 mg/kg, desencadeia seletivamente, uma sequência de alterações comportamentais e eletrencefalográficas que se iniciam nas estruturas límbicas. Estas alterações evoluem progressivamente para crises generalizadas

atingindo o estado de mal epiléptico, que por sua vez, produz alterações patológicas cerebrais difusas (Turski et al., 1983).

Após a primeira crise espontânea, os animais foram submetidos a um programa de exercício aeróbico de 45 sessões em esteira rolante, sete dias por semana na intensidade de 60% VO₂max. Uma redução significativa na frequência de crises epiléticas foi observada durante o período de treinamento físico.

Estudos subseqüentes (metabólico, eletrofisiológico e imunohistoquímico) em animais com epilepsia submetidos ao treinamento físico foram realizados para esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos nesse processo (Arida et al., 2003/2004/2007). Um estudo metabólico verificou se o treinamento físico poderia modificar a atividade funcional de ratos com epilepsia (Arida et al., 2003). Foi observado um aumento na taxa metabólica no colículo inferior e córtex auditivo nos ratos treinados com epilepsia quando comparados aos ratos sedentários com epilepsia. Vissing e colaboradores (1996) demonstraram uma maior utilização de glicose cerebral local no córtex auditivo e visual durante o exercício, sugerindo que estas mudanças não estão relacionadas diretamente ao exercício per se, mas a um maior estado de alerta mental em ratos treinados do que ratos sedentários. Uma vez que a atividade física exige um determinado nível de alerta, uma maior atenção e vigilância observada durante o exercício poderiam reduzir o número de crises epiléticas (Kuijer, 1980; Arida et al., 1999). Um estudo eletrofisiológico foi realizado para verificar o efeito do exercício aeróbico nos parâmetros eletrofisiológicos hipocampais "in vitro" de ratos com epilepsia (Arida et al., 2004). Ratos treinados com epilepsia apresentaram uma redução do número de espículas (population spikes) quando comparados com ratos não treinados. Outro estudo avaliou a ocorrência de mudanças estruturais na formação hipocampal de ratos treinados com epilepsia. Marcadores do sistema GABAérgico, como proteínas ligantes de cálcio, parvalbumina e calbindina têm sido amplamente utilizados em diferentes modelos de epilepsia para visualizar as alterações morfológicas no cérebro (Sloviter, 1989; Freund et al., 1991). Eles representam marcadores efetivos de células hipocampais e em particular, de uma população de interneurônios inibitórios (Celio, 1990). Neste sentido, os animais com epilepsia foram submetidos ao exercício voluntário (roda) ou forçado (esteira). Tanto o exercício voluntário

como o forçado provocou aumento na marcação de parvalbumina no giro dentado de ratos com epilepsia (Arida et al., 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados da literatura têm mostrado que as crises induzidas pelo exercício físico não são freqüentes. A maioria das pessoas com epilepsia pode participar de atividade física regular, com pequeno risco apresentar crises durante o exercício. No entanto, generalizações não podem ser feitas. Cada pessoa tem que ser analisada unicamente quanto ao tipo, freqüência, gravidade e impacto de suas crises epiléticas. Dados de modelos animais de epilepsia têm reforçado os efeitos positivos do exercício em humanos. Parece justificável aos médicos incentivarem pessoas com epilepsia a participar em atividades físicas e/ou esportivas regulares. Entretanto, são necessários mais estudos para confirmar os efeitos benéficos do exercício físico na epilepsia.

REFERENCIAS

1. Aisenson MR. Accidental injuries in epileptic children. *Pediatrics* 1948; 2:85-8.
2. Albrecht H., Endorphins, sport, and epilepsy: getting fit or having one, *NZ Med J* 1986; 99:915.
3. American Medical Association Committee on the Medical Aspects of Sports: Convulsive disorders and participation in sports and physical education. *JAMA* 1968; 206:1291.
4. American Academy of Pediatrics Committee on Children with Handicaps: The epileptic child and competitive school athletics. *Pediatrics* 1968; 42:700-2.
5. American Medical Association Committee on the Medical Aspects of Sports: Epileptics and contact sports. *JAMA*, 229: 820-82, 1974.
6. American Academy of Pediatrics Committee on Children with Handicaps and Committee on Sports Medicine. Sports and the child with epilepsy. *Pediatrics* 1983;72:884-5.
7. Annegers JF, Hauser WA, Coan SP, et al. A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *N Engl J Med* 1998; 338:20-4.
8. Arida RM, Vieira AJ, Cavalheiro EA. Effect of physical exercise on kindling development. *Epilepsy Res* 1998; 30:127-32.
9. Arida RM, Scorza FA, Peres CA, Cavalheiro EA. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 1999;34:99-107.
10. Arida RM, Scorza FA, Santos NF, Peres CA, Cavalheiro EA. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res* 1999; 37:45-52.
11. Arida RM, Scorza FA, Albuquerque M, et al. Evaluation of physical exercise habits in Brazilian patients with epilepsy. *Epilepsy & Behav* 2003; 4:507-10.
12. Arida RM, Fernandes MJS, Scorza FA, Preti SC, Cavalheiro EA. Physical training does not influence interictal LCMRglu in pilocarpine-treated rats with epilepsy. *Physiol. Behav* 2003;79:789-94.
13. Arida RM, Sanabria ERG, Silva AC, Faria LC, Scorza FA, Cavalheiro EA. Physical training reverts hippocampal electrophysiological changes in rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. *Physiol. Behav* 2004; 83:165-71.
14. Arida RM, Scorza CA, Scorza FA, Gomes da Silva S, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Cavalheiro EA. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* 2007;31:814-22.

15. Arida RM, Cavalheiro EA, da Silva AC, Scorza FA. Physical activity and epilepsy: proven and predicted benefits. *Sports Med* 2008a;38: 607-15.
16. Arida RM, Scorza CA, Schmidt B, de Albuquerque M, Cavalheiro EA, Scorza FA. Physical activity in sudden unexpected death in epilepsy: much more than a simple sport. *Neurosci Bull* 2008b;24(6):374-80.
17. Babb TL. Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. *Adv Neurol* 1999;79:763-79.
18. Bennett HT, Wagner T. Acute hyponatremia and seizures in an infant after a swimming lesson. *Pediatrics* 1983;72:125-27.
19. Bjorholt PG, Nakken KO, Rohme K, Hansen H. Leisure time habits and physical fitness in adults with epilepsy. *Epilepsia* 1990; 31:83-7.
20. Blumer D, Wakhlu S, Davies K, Hermann B. Psychiatric outcome of temporal lobectomy for epilepsy: incidence and treatment of psychiatric complications. *Epilepsia* 1998; 39:478-86.
21. Boucharlat J, Maitre A, Ledru J. Sport et epilepsy de l'enfant. *Ann. Med-psychol* 1973; 131:392-401.
22. Bouchard C. The consensus statement. In: Exercise, fitness and health. A consensus of current Knowledge. (Eds C. Bouchard, R.J. Shephard, T. Stephens, J.R. Sutton, B.D. McPherson). Champaign, IL, Human Kinetics Books, 1990: pp. 497-510.
23. Brown B, Van Huss C. Exercise and rat brain catecholamines. *J Appl Physiol* 1973;34:664-69.
24. Celio, MR. Calbindin D28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 1990;35:375-475.
25. Cendes F. Febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2002;17:161-64.
26. Chang B, Lowenstein DH. Mechanisms of disease. Epilepsy. *N Engl J Med* 2003; 349:1257-66.
27. Cockerell OC, Johnson AL, Sander JW, et al. Mortality from epilepsy: results from a prospective population-based study. *Lancet* 1994;344:918-21.
28. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. - Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 22:489-501, 1981.
29. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. - Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 30:389-399, 1989.
30. Commission of Pediatrics of the International League Against Epilepsy: Restrictions for children with epilepsy. *Epilepsia* 1997;38:54-6.
31. Cordova F. Epilepsy and sport. *Australian Family Physician* 1993;22:558-62.
32. De Castro J, Duncan G. Operantly conditioned running: effects on brain catecholamine concentrations and receptor densities in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav* 1985;23:495-500.
33. Denio LS, Drake ME, Pakalnis A. The effect of exercise on seizure frequency. *J Med* 1989;20:171-6.
34. Devinsky O. Quality of life in epilepsy. In: The Treatment of epilepsy: principles and practice (Ed. E. Wyllie). Baltimore, Williams & Wilkins, 1996: pp. 1243-50.
35. Devinsky O. Diagnosis and treatment of temporal lobe epilepsy. *Rev Neurol Dis* 2004;1:2-9.
36. Detour J, Schroeder H, Desor D, Nehlig A. A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. *Epilepsia* 2005; 46:499-508.
37. Dichter MA. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development. *Epilepsia* 1994;35:S51-S57.
38. Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet* 2006;367:1087-1100.
39. Engel J Jr. Update on surgical treatment of the epilepsies. Summary of the Second International Palm Desert Conference on the Surgical Treatment of the Epilepsies. *Neurology* 1993;43:1612-1617.
40. Engel J Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2001;42(6):796-803.
41. Eriksen HR, Ellertsen B, Gronningsaeter H, et al. Physical exercise in women with intractable epilepsy. *Epilepsia* 1994;35 1256-64.
42. Esquivel E, Chaussain M, Plouin P, et al. Physical exercise and voluntary hyperventilation in childhood absence epilepsy. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1991;79:127-32.
43. Fischer A, Daute KH. Die unfallsgefahrung anfallskranker kinder im schulsport un bei speilerischen Freizeitbeschäftigungen. *Med Sport* 1988;28: 93-5
44. French JK. Hypoglycaemia-induced seizures following a marathon. *NZ Med J* 1983;96:407.

45. Frenkl R, Gyore A, Meszaros J, et al. A study of the enzyme inducing effect of physical exercise in man. The 'training liver'. *J Sports Med* 1980; 20:371-6.
46. Freund TF, Ylinen A, Miettinen R, Pitkanen A, Lahtinen H, Baimbridge KG, Riekkinen PJ. Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res Bull* 1991;28:27-38.
47. Gibbs FA, Williams D, Gibbs EL. Modification of cortical frequency spectrum by changes in CO₂. *J Neurophysiol* 1940;3:49-58.
48. Goddard, G. V. - Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*, 204:1020-1021, 1967.
49. Goddard, G. V.; McIntyre, D.C.; Leech, C.K. - A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.*, 25:295-330, 1969.
50. Gotze W, Kubicki St, Munter M, Teichmann J. Effect of physical exercise on seizure threshold. *Dis Nerv Syst* 1967;28:664-67.
51. Griest JH, Klein MH, Eischens RR, et al. Running for treatment of depression. *Comp Psychiatry* 1979;20:41-54.
52. Halatchev VN. Epidemiology of epilepsy--recent achievements and future. *Folia Medica (Plovdiv)* 2000;42:17-22.
53. Haglund Y, Bergstrand G. Does Swedish amateur boxing lead to chronic brain damage? A retrospective study with CT and MRI. *Acta Neurol Scand* 1990;82: 297-302.
54. Hauser WA, Annegers JF, Elveback LR. Mortality in patients with epilepsy. *Epilepsia* 1980;21:399-412.
55. Kellett MW, Smith DF, Chadwick DW. Quality of life after epilepsy surgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;63:52-8.
56. Kemp AM, Sibert JR. Epilepsy in children and the risk of drowning. *Arch Dis Child* 1993;68:684-5.
57. Kuijjer A. Epilepsy and exercise, electroencephalographical and biochemical studies, in: Wada, J.A., Penry, J.K. (Eds), *Advances in Epileptology: The 10th Epilepsy International Symposium* New York, Raven Press, pp.543, 1980.
58. Jalava M, Sillanpaa M. Physical activity, health-related fitness, and health experience in adults with childhood-onset epilepsy: a controlled study. *Epilepsia* 1997;38:424-29.
59. Kwan P, Sander JW. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1376-81.
60. Leidy NK, Elixhauser A, Vickrey B, Means E, Willian MK. Seizure frequency and the health related quality of life of adults with epilepsy. *Neurology* 1999;53:162-6.
61. Lennox WG, Lennox MA. *Epilepsy and related disorders*. Vol. 2. Boston-Toronto: Little, Brown and Co., 1960.
62. Livingston SL, Berman W. Participation of epileptic patients in sports. *JAMA* 1983;224:236-8.
63. Loscher W. Animal models of intractable epilepsy. *Progress in Neurobiology* 1997;33:239-58.
64. McAuley JW, Long L, Heise J, Kirby T, Buckworth J, Pitt C, Lehman KJ, Moore JL, Reeves AL. A Prospective Evaluation of the effects of a 12-week outpatient exercise program on clinical and behavioral outcomes in patients with epilepsy. *Epilepsy Behav* 2001;2:592-600.
65. McLaurin R. Epilepsy and contact sports: factors contraindicating participation. *JAMA* 1973;225:285-87.
66. Martinsen EW, Medhus A, Sandvik L. Effects of aerobic exercise on depression: a controlled study. *BMJ* 1985;291:109.
67. Millington JT. Should epileptics scuba dive? Correspondence. *JAMA* 1985; 254:22:3182-83.
68. Nakken KO, Bjorholt PG, Johannessen SI, Loyning T, Lind E. Effect of physical training on aerobic capacity, seizure occurrence, and serum level of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. *Epilepsia* 1990;31:88-94.
69. Nakken KO. Physical exercise in outpatients with epilepsy. *Epilepsia* 1999;40:5: 643-65.
70. Nashef L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. *Epilepsia* 1997;38:6-8.
71. Noakes ID, Goodwin N, Raymer BL, Branken T, Taylor RKN. Water intoxication, a possible complication during endurance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1984;17:370-75.
72. Pearn J, Bart R, Yamaoka R. Drowning risks to epileptic children: a study from Hawaii. *BMJ* 1978; 2(6147):1284-85.
73. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II, Motor seizure. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1972;32:281-294.

74. Roth DL, Wiebe DJ, Fillingim RB, et al. Life events, fitness, hardiness, and health: a simultaneous analysis of proposed stress resistance effects. *J Pers Soc Psychol* 1989;57:136-42.
75. Roth DL, Goode KT, Williams VL, Faught E. Physical exercise, stressful life experience, and depression in adults with epilepsy. *Epilepsia* 1994;35:1248-55.
76. Sander JW. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 1993;34:1007-16.
77. Sander JWAS. Etiology na Risk Factors. In: World Health Organization Editor. Atlas: Epilepsy care in the world. Geneva: WHO press, p. 26-7. 2005.
78. Scorza FA, Colugnati DB, Pansani AP, Sonoda EY, Arida RM, Cavalheiro EA. Preventing tomorrow's sudden cardiac death in epilepsy today: what should physicians know about this? *Clinics* 2008;63:389-94.
79. Shepard RJ. Costs and benefits of an exercising versus a nonexercising society. In: Exercise, fitness and health (Eds C. Bouchard, R.J. Shepard, T. Stephens, J.R. Stton, B.D. McPherson). A consensus of current knowledge. Champaign, IL, Human Kinetics Books, 1990: 49-60.
80. Sloviter RS. Calcium-binding protein (Calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J CompNeurol* 1989;280:183-96.
81. Steinhoff BJ, Neuss K, Thegeder H, et al. Leisure time activity and physical fitness in patients with epilepsy. *Epilepsia* 1996;37:1221:27.
82. Steptoe, A., Edwards, S., Moses, J., Mathews, A. The effects of exercise training on mood and perceived coping ability in anxious adults from the general population. *J Psychosom Res* 1989;33:537-47.
83. Stollberger C, Finsterer J Cardiorespiratory findings in sudden unexplained/unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Epilepsy Res* 2004; 59:51-60.
84. Temkin NR, Davis GR. Stress as risk factors for seizures among adults with epilepsy. *Epilepsia* 1984;25:450-56.
85. Tomson T, Walczak T, Sillanpaa M, Sander JW. Sudden unexpected death in epilepsy: a review of incidence and risk factors. *Epilepsia* 2005;46(Suppl 11):54-61.
86. Turski WA, Czuczwar SJ, Cavalheiro EA, Turski L, Kleinrok Z. Acute and long-term effects of systemic pilocarpine in rats: spontaneous recurrent seizures as a possible model of temporal lobe epilepsy. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1983;324:25R.
87. Van Linschoten R, Backx FJG, Mulder OGM, et al. Epilepsy and sports. *Sports Med* 1990;10:9-19.
88. van Willigen J. Hardlopers en doodlopers; oververhitting in een gematigd klimaat (Running and exhaustion; hyperthermia in a moderate climate). *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 1988;132:437-40.
89. Vissing J, Andersen M, Diemer NH. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:729-36.
90. Wasserman K, Wipp B, Koyal S, Beaver W. Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol* 1973;35:236-43.
91. Westerberg V, Lewis J, Corcoran ME. Depletion of noradrenaline fails to affect kindling seizures. *Exp Neurol* 1984;84:237-40.

TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE EN LESIONES TRAUMÁTICAS DE MÉDULA ESPINAL

¹Salgado-Ceballos H, ²Rodríguez-Baeza MMJ, ²Carrillo-González NJ,
²Gudiño-Cabrera G.

¹Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, México, D.F., México.

²Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural, Instituto de Neurobiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

RESUMEN

La lesión traumática de médula espinal cada vez es más frecuente, y dependiendo de la severidad, puede producir parálisis con consecuencias devastadoras para los individuos que la padecen. Por lo anterior, se han planteado diversas estrategias experimentales a fin de proteger el tejido adyacente al sitio de lesión para evitar que el daño se extienda y la afectación funcional se incremente o se vuelva permanente (neuroprotección). Debido a que la capacidad de regeneración espontánea de la médula espinal es muy limitada, también se han desarrollado diversas estrategias neurorregeneradoras encaminadas a favorecer la reparación del tejido afectado y a permitir la recuperación de las funciones perdidas. En este contexto, el implante de células madre parece prometedor debido a sus propiedades generales y a que actualmente se conocen sus inmunomarcadores, y los métodos de cultivo, separación e identificación para obtenerlas a partir de diversas zonas de organismos adultos, siendo la médula ósea la principal fuente, aunque también se han aislado de tejido neural y adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal.

Nuestro grupo de investigación trabaja en el cultivo, diferenciación y trasplante de células precursoras neurales, de células mesenquimales de médula ósea y de sangre de cordón umbilical, con la finalidad de obtener células para aplicarlas en diversos modelos de lesión traumática de médula espinal y en un futuro, para tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, entre otras.

LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un problema de salud pública que en la mayoría de los casos (81.7%) afecta a la población en edad económicamente productiva (16 a 30 años), pone en riesgo la vida de los pacientes en la fase aguda, y produce una serie de secuelas incapacitantes con devastadoras repercusiones personales, económicas y sociales (Whiteneck, 1992; Ditunno y Formal, 1994; Pérez y col., 2008).

Aproximadamente el 40% de este tipo de lesiones son completas, lo cual produce pérdida total de las funciones motora, sensitiva y autonómica por debajo del sitio dañado, traduciéndose en paraplejia si solo afecta miembros inferiores o en tetraplejia si involucra miembros inferiores y superiores. El resto de las lesiones son incompletas y se caracterizan por presentar cierto grado de funcionalidad por debajo del sitio afectado (Tator y Fehling, 1991).

Entre las principales causas de la LTME se encuentran los accidentes automovilísticos (50.4%), las caídas (23.8%), los accidentes por diversas actividades deportivas (9%) y las lesiones causadas por violencia ya sea con arma blanca o con arma de fuego (11.2%) (Ho y col., 2007).

En México, se ha reportado que la incidencia anual para la LTME es de aproximadamente 18.1 casos por cada millón de habitantes, presentando el pico máximo de edad a los 30 años y siendo el sexo masculino el más afectado (Pardini, 1998; Pérez y col., 2008; Estrada y col., 2007), mientras que en los Estados Unidos se estima que existen 40 casos por millón de habitantes, o aproximadamente 11,000 nuevos casos por año sin incluir aquellos que mueren al momento del accidente.

Basándonos en la conservadora cifra para la incidencia de 14 personas por millón de habitantes en el mundo occidental desarrollado, se estima que más de 92,000

personas sufren una LTME cada año, quedando condenadas a una silla de ruedas por 40 años o más y generando, tan sólo en los Estados Unidos de Norteamérica, un gasto aproximado de 4 billones de dólares anuales, incluyendo los gastos médicos que requieren de por vida estos pacientes y las pérdidas económicas por ingresos o productividad que genera (Centro de Estadísticas Nacionales de Lesiones de Médula, 2006).

Lesión primaria

La LTME puede ocurrir a cualquier nivel de la médula, lo que aunado a la gravedad de la lesión va a ser determinante en el grado de afectación de las funciones motoras, sensitivas y autonómicas, y resultado directo tanto del mecanismo mediante el cual se produzca la lesión primaria como de los mecanismos secundarios de lesión que se desencadenen.

En este contexto, el daño a la médula espinal ocasionado inicialmente por un impacto mecánico directo, genera la ruptura de vasos sanguíneos como consecuencia de la cinética del traumatismo, pues se llevan a cabo desplazamientos óseos y de ligamentos dentro del canal medular (Harkey y col., 2003), este mecanismo de daño es conocido como lesión primaria, después del cual se desencadena una cascada compleja de eventos que producen el daño secundario que conduce a la muerte progresiva de neuronas y glía y a la destrucción de axones inicialmente viables, así como a la activación de células y mecanismos que imposibilitan los procesos de regeneración endógenos.

Lesión secundaria

A consecuencia de los mecanismos de lesión secundaria, los grupos de neuronas cercanas al área lesionada o conectadas con ella, comienzan a morir pocas horas o días después del trauma, aunque en número mayor que las neuronas que mueren tras la lesión primaria, por lo que se considera que la lesión secundaria es, posiblemente, el principal responsable de la pérdida de función en la mayoría de las lesiones traumáticas del sistema nervioso central (SNC) (Verdú y Nieto, 1998).

La destrucción de vasos sanguíneos y el espasmo vascular son los responsables del proceso isquémico y de los efectos asociados como la anoxia y la hipoglucemia. Después de la isquemia, se observa una fase de hiperemia, provocada por una reducción del pH perivascular y vinculada a la acumulación de metabolitos ácidos

tales como el lactato (Mautes y col., 2000). Simultáneamente, las células sanguíneas y las proteínas del plasma invaden el área lesionada y, el edema, que resulta tanto de la acumulación del fluido extracelular como de la activación de los astrocitos, se hace evidente 24 horas después de la lesión, mientras que la afluencia de células inflamatorias, incluyendo neutrófilos y macrófagos, la activación de la microglía, la expresión de citocinas tales como IL-1 β , TNF α , e IL-6 y un sin número de metaloproteinasas de la matriz extracelular, también contribuyen al proceso de lesión secundaria (Kwon y col., 2005). Aunado a lo anterior, la generación de radicales libres por diversas vías y la peroxidación de lípidos, producen la destrucción local de las membranas celulares, al igual que la acumulación de neurotransmisores excitadores como el glutamato, que al interactuar con los receptores NMDA (N-Methyl-D-Aspartato) y no-NMDA localizados en neuronas y células gliales, facilitan el influjo masivo de calcio a la célula y por consiguiente la activación de un gran número de enzimas líticas responsables de la muerte celular mediante el proceso conocido como excitotoxicidad.

En la actualidad no existe ningún tratamiento aprobado por la FDA que pueda ser administrado a pacientes con LTME a fin de disminuir al máximo los efectos deletéreos generados por los mecanismos secundarios de lesión o para regenerar el tejido nervioso lesionado, por lo que aquellos pacientes con LTME completa quedan confinados a una silla de ruedas de por vida y aquellos con LTME incompleta permanecerán con diversos grados de déficit funcional que repercutirán directamente sobre ellos, sobre su familia y sobre la sociedad en la que se desarrollan. Debido a ello, se continúa en la búsqueda de alternativas terapéuticas que puedan mejorar las condiciones funcionales de estos pacientes, para lo cual se han desarrollado diferentes modelos experimentales.

MODELOS EXPERIMENTALES DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL

Existen diversos modelos de LTME, los cuales se clasifican de acuerdo al agente causal de la lesión, siendo la rata el animal más frecuentemente utilizado para este fin, no solo por su disponibilidad sino también porque los cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales que se producen después de la lesión en este animal son similares a los observados en los seres humanos. No obstante lo anterior, debido a

su complejidad, hasta la fecha no existe un modelo en particular que reúna todos los aspectos observados en una LTME en humanos.

Modelo de Contusión

El primer experimento animal de una LTME, fue desarrollado por Allen en 1911 para lo cual dejó caer, a través de un tubo, un objeto de un peso conocido directamente sobre la médula espinal expuesta de perros. Actualmente se emplea el *NYU impactor*, un dispositivo electromecánico con transductor de fuerza conectado a una computadora, el cual fue desarrollado en la Universidad de Rutgers y consiste en dejar caer una pesa de 10 gramos a un altura de 6.25, 12.5, 25 ó 50 mm de forma directa sobre la médula espinal expuesta, con lo cual, dependiendo de la altura con la que se deje caer el dispositivo, se producirán diferentes grados de lesión en la médula espinal (Basso y col., 1996).

En este contexto es muy importante tener en cuenta que si las lesiones son leves, la recuperación espontánea se producirá rápidamente y será difícil evaluar el potencial de las propuestas terapéuticas, mientras que si las lesiones son severas el resultado funcional será muy limitado y se podrían descartar estrategias terapéuticas potencialmente útiles, por lo que en la mayoría de los casos se opta por realizar los trabajos de experimentación en lesiones de intensidad moderada.

Modelo de Compresión

El modelo por compresión consiste en aplicar una fuerza sobre la médula espinal de forma continua o persistente a lo largo de un intervalo de tiempo, un ejemplo es la utilización de clips para aneurisma colocados directamente sobre la médula espinal, lo cual permite producir lesiones de diferente severidad en función del tiempo o de la fuerza aplicada con el clip bajo la superficie ventral de la médula y por encima de la superficie dorsal (Josh y Fehlings, 2002). El clip utilizado se calibra por una fuerza de compresión conocida y posteriormente se comprime la médula por un tiempo determinado (por ejemplo, 60 segundos) antes de su liberación y eliminación (Stephen y col., 2007).

Modelo de sección medular

En este modelo se puede realizar una sección completa de la médula espinal o una hemisección dorsal o lateral de la misma.

A pesar de que este tipo de lesión no se ve de forma típica en pacientes con LTME, es muy útil debido a que desconecta de forma efectiva las vías axonales ascendentes y descendentes produciendo la interrupción de tractos espinales específicos, lo cual permite probar de forma contundente estrategias terapéuticas en el área de la neuroregeneración.

ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS PARA LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL

Debido a que actualmente no se cuenta con alguna estrategia terapéutica eficaz para restablecer la función neurológica en este tipo de patología, en las últimas décadas se ha realizado un arduo trabajo en este rubro, en el que las estrategias terapéuticas existentes hasta el momento se pueden dividir en aquellas encaminadas a proteger a las neuronas sobrevivientes en etapas tempranas posteriores a la LTME (neuroprotección) y en las que tienen por objetivo recuperar las células o las funciones perdidas (neuroregeneración) después de la lesión.

Estrategias de neuroprotección

Las estrategias de neuroprotección son aquellas enfocadas a detener y neutralizar los mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan inmediatamente después de una LTME. En este contexto, los fármacos son la principal herramienta empleada para detener el proceso autodestructivo post-lesión del SNC (Pointillart y col., 2000; Geisler y col., 2001; Diaz y Rios, 2002; Torres y col., 2009 y 2010).

Estrategias de neuroregeneración

Cuando las estrategias de neuroprotección no son lo suficientemente efectivas o ha pasado mucho tiempo después de la LTME se recurre a estrategias de neuroregeneración, empleándose en este campo una gran variedad de implantes, transplantes, fármacos y diversos esquemas de rehabilitación física para recuperar las células neuronales y las funciones pérdidas después de una LTME (Gimenez-y-Ribotta y col., 1998; Grijalva y col., 2003; Salgado-Ceballos y col., 2003; Olayo y col., 2008). Dentro del campo de los transplantes celulares, en últimas fechas ha habido un campo experimental creciente empleando células madre (CM) en condiciones diversas para el tratamiento de afecciones del SNC como lo es la LTME (McDonal y

col., 1999), en la que nuestro grupo se encuentra trabajando y cuyos resultados se describirán más adelante.

Células madre

La diferenciación de las CM hacia un fenotipo funcional específico es un paso crucial, en el área de los trasplantes celulares, por lo que es importante el conocimiento del ambiente en el que las células se mantendrán proliferando en estado indiferenciado, para posteriormente inducir su diferenciación *in vitro* y optimizar su empleo como tejido de trasplante.

Se ha planteado que en algunos casos, las células maduras que han sufrido alguna lesión, son capaces de secretar no solo moléculas de atracción para las CM que se encuentran distribuidas por todo el organismo, sino que además liberan señales de diferenciación, sustituyendo así a las células dañadas (Kolf y col., 2007).

Aún falta mucho por investigar respecto al uso de los distintos tipos de CM, determinar si estas células se integran al tejido lesionado, si favorecen la reparación del tejido mediante su propia diferenciación hacia el tipo celular requerido, o si solo se integran coordinando la organización de los tipos celulares para restaurar su función (Ankrum y Karp, 2010).

Las CM se caracterizan por su capacidad de dividirse y diferenciarse a diversos tipos celulares, se distribuyen ampliamente en toda la anatomía, aunque son más abundantes en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, en la etapa adulta los organismos muestran una amplia distribución, con la importante función de reemplazar las distintas células que se eliminaron como parte de su ciclo de vida natural, pero además se encargan de reparar lesiones de manera espontánea. Es así que las CM son capaces de responder a las diversas señales que se producen durante la inflamación (Blanchet y McNagny, 2009), se renuevan y proliferan en diversas patologías como en la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y epilepsia, así como durante el envejecimiento e incluso en cáncer (Yadirgi y Marino, 2009).

Por su importante y amplia función, las CM constituyen una herramienta valiosa para el estudio de los mecanismos de desarrollo y regeneración, así como para su aplicación en la terapia celular que ayuda a reemplazar o reparar órganos dañados, y aliviar diversas enfermedades (Tárnok y col., 2010; Ankrum y Karp, 2010; Kolf y col., 2007).

A pesar de que las células madre embrionarias cuentan con una mayor plasticidad y capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares, el inconveniente es que generan diversos problemas éticos y culturales, restricciones que no tienen las células madre obtenidas de un adulto (Perl y col., 2010).

Las CM de adulto pueden clasificarse con base en su origen anatómico, de allí que se pueden obtener a partir de médula ósea, tejido adiposo, cerebro, bazo, hígado, riñón y músculo, entre otros (Kolf y col., 2007).

Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (CMM) se obtienen principalmente a partir de la médula ósea, sin embargo, se pueden obtener de diversas fuentes, tales como sangre periférica, cordón umbilical, tejido adiposo, músculo esquelético, membrana sinovial y otros tejidos conectivos (Perl y col., 2010).

Se cree que las CMM, a diferencia de las células hematopoyéticas, no son capaces de reemplazar el tejido dañado, si no que tienen características especiales que estimulan procesos de regeneración. Por una parte se propone que las CMM inducen la expresión de factores de crecimiento y citocinas de forma local y a distancia. Aunque son células con una capacidad de diferenciación y proliferación limitada, éstas células exhiben propiedades antiproliferativas y anti-inflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo*, convirtiéndolas en excelentes candidatos para regular procesos autoinmunes, y proporcionando a su vez la ventaja de transferir estas células sin la necesidad de acondicionamiento. Además, las CMM favorecen la remodelación del tejido, la reducción de la zona lesionada, la formación de la cicatriz, la reparación vascular, la angiogénesis, el reclutamiento de otros factores que favorecen la regeneración, y albergar CM, favoreciendo así la reparación del tejido dañado. Las CMM también inhiben la proliferación y activación de las células *natural killer* y de las células B, favoreciendo con ello la inmunotolerancia del organismo receptor (Ankrum y Karp. 2010; Perl y col., 2010). Por otra parte se propone, que el proceso de inflamación también favorece el proceso de fusión celular, en el que las CM se fusionan con células residentes que han envejecido o sufrido alguna lesión para proporcionarle nuevas capacidades al intercambiar material genético (Singec y Snyder, 2008).

Debido a que se ha detectado CMM en regiones perivasculares mediante marcadores específicos, se ha propuesto que los pericitos podrían funcionar como CMM (Kolf y cols. 2007; Caplan, 2008).

Células madre neurales

Las células madre neurales (CMN) se han encontrado en dos regiones principales neurogénicas como son el hipocampo y la zona subventricular y en algunas otras regiones incluyendo a la médula espinal (Temple, 2001).

Debido a su pluripotencialidad las CMN han sido consideradas una buena opción para ser utilizados en terapias basadas en trasplantes celulares, debido a que pueden ser manipuladas y diferenciadas a otros tipos celulares incluyendo los que no son de su estirpe.

Las CMN pueden ayudar a restablecer las funciones perdidas a consecuencia de una LTME, ya que pueden ser usadas para sustituir a las células neuronales perdidas, para proporcionar los factores neurotróficos requeridos para la regeneración neuronal y para favorecer la supervivencia de las células que permanecieron viables después de la lesión (Tarasenko y col., 2007).

Reportes previos sugieren que los precursores neurales (PN) endógenos que se encuentran en la médula espinal, proliferan y se diferencian exclusivamente en astrocitos pero no en neuronas después de una LTME (Okano y col., 2003), mientras que otros estudios revelan que los PN que se localizan en la médula espinal (en el parénquima, en la sustancia blanca y cerca del canal ependimal) en condiciones no patológicas, se diferencian en oligodendrocitos y astrocitos pero no en neuronas. No obstante lo anterior, se ha demostrado que los PN de médula espinal dan origen a neuronas *in vitro* (Obermair y col., 2008).

Los mecanismos que influyen en el destino de los PN trasplantados no están claros. Es posible que tanto el microambiente del tejido del huésped como las propiedades intrínsecas de los PN trasplantados guíen el fenotipo de la diferenciación después del trasplante (White y col., 2001).

Caracterización de las células madre

Existe un evidente interés por caracterizar a las CM de diversos tejidos, Tárnok y colaboradores (2010) describieron mediante citometría de flujo, un conjunto de marcadores que expresan las diferentes CM en distintas etapas del desarrollo y en

distintos tejidos, y aunque, la información es de gran utilidad para identificar y aislar estos tipos celulares, para mejorar el diagnóstico clínico y la investigación, no se puede tomar como único parámetro, ya que la expresión de marcadores varía en un mismo tipo celular dependiendo de las proteínas de la matriz extracelular, el contacto con las células vecinas, la exposición a las diferentes señales extracelulares, y de factores físicos tales como el oxígeno y el estrés, entre otros. Lo anterior significa en conjunto la variación de la condición fisiológica de un organismo, que debe considerarse aunada al hecho de que al extraer las células, aumenta la variación que depende del proceso con el que se obtienen las células, así como de la manipulación y las condiciones en las que se mantienen, y es por eso que se dificulta la reproductibilidad del procesamiento de las mismas (Watt y Driskell, 2010; Kolf y col., 2007).

Las CM se caracterizan por expresar vimentina, nestina, Musashi 1 y Sox 2, entre otros (Okano, 2010). Sin embargo, más que hablar de los marcadores que nos permiten distinguir a las CM, es importante identificar en la medida de lo posible, las ventajas que se obtienen con la expresión de estas proteínas, y de allí tratar de dilucidar cuál sería el momento funcional ideal para trasplantarlas (Tárnok y col., 2010).

Glía con capacidad promotora de la regeneración

Las células de aldainoglia comprenden un tipo especial de células gliales localizadas en el SNC y se caracterizan por favorecer la regeneración neural en mamíferos. La glía envolvente (GE) ("Schwann-like"), es el tipo de aldainoglia mejor caracterizada (Gudiño-Cabrera y Nieto-Sampedro, 1999; Gudiño-Cabrera y Nieto-Sampedro, 2000), forma parte de la glía *limitans* en la zona de transición entre el sistema nervioso periférico y el SNC del nervio olfatorio, y es la encargada de acompañar a los axones en crecimiento desde la mucosa olfatoria hasta el bulbo olfatorio, de allí que se ha estudiado y utilizado en diversos modelos de reparación neural (Franklin y Barnett, 1997).

Las bondades de este tipo celular se deben a sus propiedades únicas, que comparte tanto con los astrocitos, como con las células de Schwann, mostrando un inmunofenotipo de célula inmadura que se caracteriza por la expresión del receptor de baja afinidad para neurotrofinas (p75), el receptor de estrógenos, S100, así como

GFAP y vimentina, entre otros, los cuales se relacionan con las funciones particulares de plasticidad (Gudiño-Cabrera y Nieto-Sampedro, 1999), y que a su vez comparte con las CMM, dentro de los que destacan p75 y vimentina. Además, una vez implantada la GE en la zona de lesión, es capaz de integrarse al tejido, secreta factores neurotróficos, inhibe la formación de la cicatriz, promueve la angiogénesis y favorece el crecimiento de los axones motores y sensitivos a través del sitio de lesión.

Por lo anterior, la GE ha sido utilizada en varios modelos de reparación de médula espinal, tales como sección completa, hemisección, contusión y modelos de desmielinización, con resultados alentadores (Mackay-Sim, 2005).

REPARACIÓN DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL CON TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE. ESTUDIOS PRELIMINARES.

En fechas recientes y con el apoyo de diversos estudios, se han visto avances notables en la reparación de la LTME mediante terapia celular que va desde la aplicación de GE, células precursoras diferenciadas hacia GE y CM de diversas fuentes, hasta el co-trasplante de distintos tipos celulares (Mackay-Sim, 2005).

Con el fin de probar el efecto terapéutico de diferentes tipos de trasplantes celulares, en nuestro laboratorio se implementó el modelo de sección completa de médula espinal en rata, la cual se realiza en el nivel torácico 9 (T9) con la finalidad de producir paraplejía en los animales a estudiar (Figura 1).

Las células que se trasplantaron provenían de CMN de embriones de rata de 14 días de gestación, las cuales fueron diferenciadas *in vitro* al fenotipo de GE (Figura 2). También se realizaron trasplantes de CMN sin diferenciar para ver si existía alguna ventaja entre un tipo celular y el otro en este modelo de lesión. Los trasplantes se realizaron en la fase aguda de la LTME, es decir inmediatamente después de producir el daño.

La recuperación funcional se evaluó mediante la escala motora Basso, Beattie, Bresnahan o BBB, la cual consta de 22 puntos (va del 0 al 21) y que analiza las características de la marcha o locomoción considerando las articulaciones de la cadera, la rodilla y el tobillo (Basso y col., 1996). También se realizaron pruebas histológicas (Figura 3) y de inmunocitoquímica para evaluar las características

morfológico-morfométricas del sitio de la lesión y su respuesta al trasplante realizado.

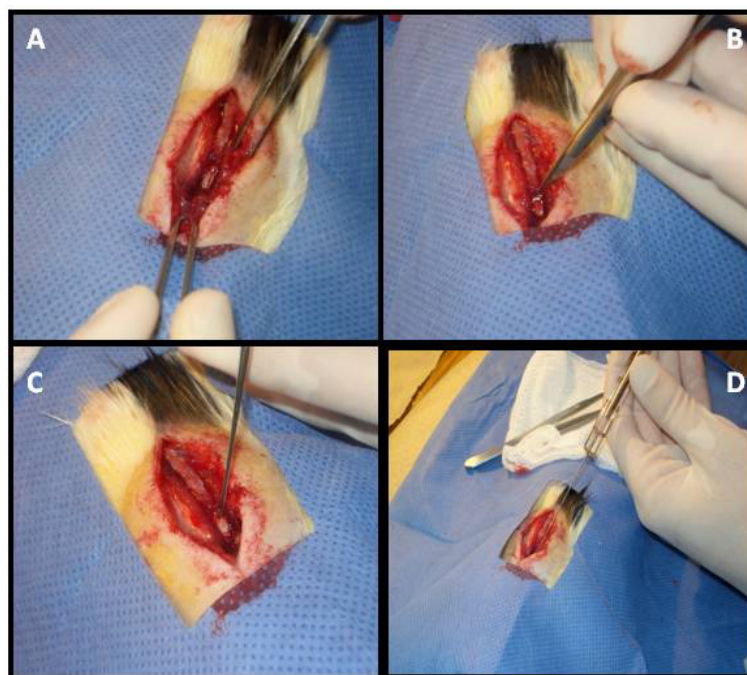


Figura 1. Modelo de lesión por sección completa de médula espinal. (A) Exposición de la médula espinal mediante laminectomía a nivel torácico 9. (B) Sección longitudinal de las meninges y sección transversal completa de la médula espinal. (C) Comprobación de que la sección es completa mediante el uso de un gancho de microcirugía. (D) Trasplante celular mediante inyección directa en el sitio de lesión.

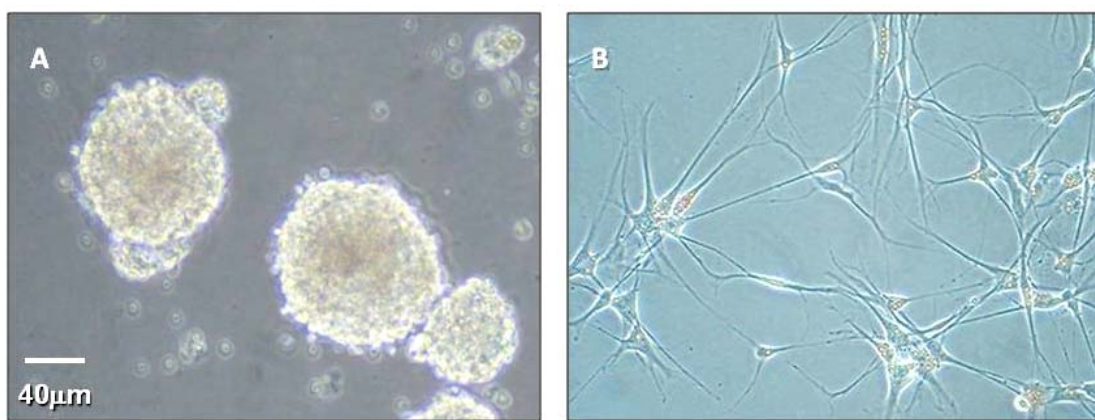


Figura 2. Cultivos Celulares de precursores neurales de Embriones de 14 días (A) y de glía envolvente purificada (B).

En este modelo de LTME se observó una mayor preservación del tejido nervioso y una mejor recuperación funcional en las ratas que recibieron el trasplante de CMN

sin diferenciar al compararlas con las ratas que recibieron el trasplante de CMN diferenciadas.

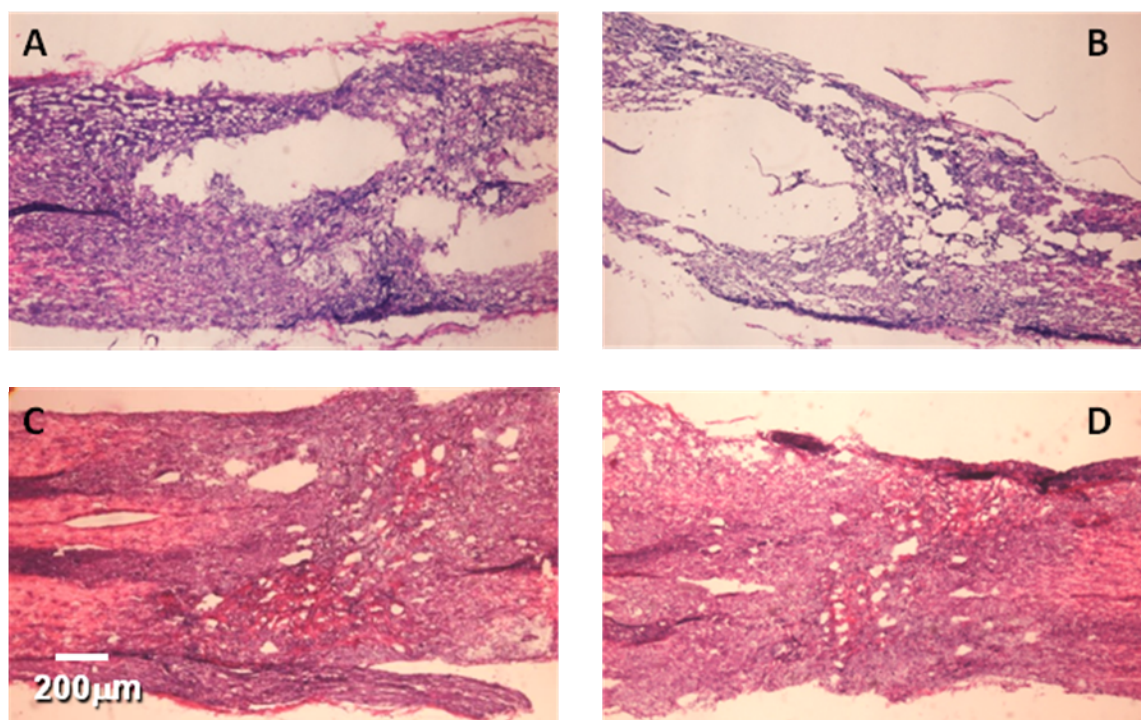


Figura 3. Cortes longitudinales de la médula espinal de ratas con sección completa de la médula espinal. Se muestran las médulas de ratas del grupo control (A y B) y de las trasplantadas (C y D) con CMND (células madre neurales diferenciadas al fenotipo de glía envolvente), en donde observamos menor destrucción del tejido nervioso y la formación de menos cavidades quísticas en las ratas que fueron trasplantadas con CMND (C y D) con respecto a las que no recibieron ningún trasplante (A y B). Tinción hematoxilina y eosina.

Por lo anterior, consideramos que la utilización terapéutica de las CM después de una LTME por sección completa, representa innumerables ventajas, ya que son células con capacidad de desarrollarse y trasdiferenciarse favoreciendo la reparación de tejidos, en caso de daño o lesión a la médula espinal.

Son muchas las expectativas del beneficio terapéutico a partir del trasplante de las CM, tanto en la utilización de las CMN expandidas *in vitro*, como de las CMM obtenidas de médula ósea y diferenciadas hacia células con fenotipo neural. El estroma mesenquimal además, provee una población de células renovables, que crecen rápidamente en cultivo y que es posible diferenciar en neuronas o células gliales, entre otros tipos celulares. El caso del reemplazo neural es particularmente interesante, ya que las fuentes alternativas de donantes representan obstáculos diversos, que van desde los problemas éticos del uso de embriones, o de células

provenientes del donante cadavérico convencional (por muerte cerebral), hasta los problemas inmunológicos que trae consigo el empleo del trasplante alogénico.

REFERENCIAS

1. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends in molecular medicine*, 2010;16(5):203-209.
2. Basso DM, Beattie MS. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Experimental Neurology*, 1996;139:244-256.
3. Blanchet M-R, McNaghy K. Stem cells, inflammation and allergy. *Allergy, Asthma and Clinical immunology*, 2009;5(1):13.
4. Centro de Estadísticas Nacionales de Lesiones de Médula. The University of Alabama at Birmingham. Lesión de la médula espinal. Datos y Cifras a la Vista. 2006. 1-2.
5. Caplan A. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell* 2008;3(3):229-230.
6. Diaz RA, Guízar SG, Rios CC. Estrategias neuroprotectoras después de una lesión traumática de médula espinal. *Rev Med IMSS* 2002; 40 (5): 437-455.
7. Ditunno JF, Formal CS. Chronic spinal cord injury. *New Engl J Med* 1994;330:550-556.
8. Estrada M, Carreon A, Parra M, Ibarra C, Velasquillo C, Belkin J. Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Publica Mex*, 2007;49(6):437-444.
9. Franklin RJ, Barnett SC. Do olfactory glia have advantages over Schwann cells for CNS repair? *Journal of neuroscience research*, 1997;50(5):665-672.
10. Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D. The sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine* 2001; 26 (24): S87-S98.
11. Gimenez-y-Ribotta M, Gaviria M, Menet V, Privat A. Strategies for regeneration and repair in spinal cord traumatic injury. *Progress in brain research*, 2002; 137: 191-212.
12. Grijalva I, Guízar-Sahagún G, Castañeda-Hernández G, Mino D, Maldonado-Julián H, Vidal-Cantú G, Ibarra A, Serra O, Salgado-Ceballos H, Arenas- Hernández R. Efficacy and safety of 4-aminopyridine in chronic spinal cord injured patients: randomized, double blind controlled clinical trial. *Pharmacotherapy*, 2003; 23 (7): 823-834.
13. Gudino-Cabrera G, Nieto-Sampedro M. Estrogen receptor immunoreactivity in Schwann-like brain macroglia. *Journal of neurobiology*, 1999;40(4):458-470.
14. Gudino-Cabrera G, Nieto-Sampedro M. Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia*, 2000; 30(1):49-63.
15. Harkey HL, White EA, Tibbs RE. A clinician's view of spinal cord injury. *The anatomical record*, 2003;271(1):41-48.
16. Ho, H. Wuermsler, L. Priebe, M. Chiodo, A. Scelza, M. Kirshblum, S. *Spinal Cord Injury Medicine*. 1. Epidemiology and Classification. *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88(1): S49-S54.
17. Joshi M, Fehlings MG. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J Neurotrauma*, 2002;19: 175-190
18. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research and Therapy*, 2007;9(1):204.
19. Kwon B, Fisher C, Dvorak M, Tezlaff W. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*, 2005; 30(17): 3-13.
20. McDonal JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DJ, Choi DW.. Transplanted embryonic stem cell survive differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Medicine* 1999;5:1410-1412.
21. Mackay-Sim A. Olfactory ensheathing cells and spinal cord repair. *Keio Journal of medicine* 2005;54(1):8-14.
22. Mauter A, Weinzierl M, Donovan F, Noble LJ. Vascular Events After Spinal Cord Injury: Contribution to Secondary Pathogenesis. *Physical Therapy*, 2000;80 (7): 673-687.
23. Ogle BM, Cascalho M, Platt JL. Biological implications of cell fusion. *Molecular cell biology*, 2005;6:567-575.

24. Okano H. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences.* 2010;86(4):438-450.
25. Olayo R, Ríos C, Salgado-Ceballos H, Cruz G, Morales J, Olayo G, Alcaraz-Zubeldia, M, Alvarez AL, Mondragón R, Morales A, Diaz-Ruiz A. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *Journal of Materials Science; Materials in Medicine* 2008;19 (2):817-826.
26. Pardini CM. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Tesis de Doctorado de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1998.
27. Pérez R, Martín del campo S, Renán S, Duran S. Aspectos epidemiológicos de la lesión medular de la población del Centro Nacional de Rehabilitación. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación*, 2008; 20: 74-82.
28. Perl L, Weissler A, Mekori YA, Mor A. Cellular Therapy in 2010: Focus on autoimmune and cardiac diseases. *The Israel Medical Association journal*, 2010; 12:110-115.
29. Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassié P, Thicoipé M, Dabadie P. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord.* 2000; 38:71-76.
30. Salgado-Ceballos H, Grijalva I, Guizar-Sahagun G, Martínez A, Espitia AL, Feria-Velasco A. Predegenerated peripheral nerve graft with and without methylprednisolone administration after traumatic spinal cord injury in adult rats. *Neuroscience Research Communications* 2003; 33 (2): 77-85.
31. Singec I, Snyder EY. Inflammation as a matchmaker: revisiting cell fusion. *Nature Cell Biology*, 2008;10(5):503-505.
32. Stephen M. Onifer, Alexander G. Rabchevsky, and Stephen W. Scheff. Rat Models of Traumatic Spinal Cord Injury to Assess Motor Recovery, *ILAR Journal*, 2007;48:385-395.
33. Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry Part A*, 2010;77A:6-10.
34. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanism. *Journal of neurosurgery*, 1991;75:15-26
35. Temple S. The development of neural stem cell. *Nature.* 2001;414(6859):112-117.
36. Torres S, Salgado-Ceballos H, Rios C, Guizar-Sahagún G, Orozco-Suarez S, Díaz-Ruíz A, Torres JL, Martínez A, Lara A, Collado C. Deleterious effect of early metabolic reactivation after traumatic spinal cord injury. *Spinal Cord* 2009;47, 745-750.
37. Torres S Salgado-Ceballos H, Rios C, Torres JL, Orozco-Suarez S, Díaz-Ruíz A, Martínez A, Rivera-Cruz M, Lara A, Collado C, Guizar-Sahagún G. Early metabolic reactivation versus antioxidant therapy after a traumatic spinal cord injury in adult rats. *Neuropathology*, 2010;30(1):36-43.
38. Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal society B*, 2010;365:155-163.
39. White PM, Morrison SJ, Orimoto K, Kubu CJ, Verdi JM, Anderson DJ. Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals. *Neuron*, 2001;29: 57-71.
40. Whiteneck GG, Charlifue SW, Frankel HL, Fraser MH, Gardner BP, Kerhart KA, Krishnan KR, Meter RR, Nuseibeh I, Short DJ, Silver JR. Mortality, morbidity, and psychosocial outcomes of persons spinal cord injured more than 20 years ago. *Paraplegia*, 1992;30:617-630
41. Yadirgi G, Marino S. Adult neural stem cells and their role in brain pathology. *The Journal of pathology*, 2009;217(2):242-253.

O EFEITO NEUROPROTETOR DA MELATONINA NA EPILEPSIA

¹Amado D, de Lima E, ²Naffah-Mazzacoratti MG, ²Cavalheiro EA.

¹Disciplinas de Neurologia Experimental, y ²Departamento de Neurologia/Neurocirurgia, Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil.

INTRODUÇÃO

A melatonina é uma indolamina, sintetizada pelos pinealócitos (células da glândula pineal) a partir da serotonina, substância que existe em grande quantidade nessas células. No momento em que escurece, ocorre a ativação simpática e aumenta a liberação de noradrenalina que atua fundamentalmente sobre os receptores adrenérgicos α -1 e β 1 localizados nos pinealócitos, produzindo aumento de cálcio intracelular e adenosina monofosfato cíclica (AMPc) resultando na ativação da enzima N-acetiltransferase (NAT) que catalisa a síntese da melatonina (Reiter, 1991). Depois de sintetizada, a melatonina é liberada de forma rápida e passiva na corrente sanguínea e metabolizada principalmente no fígado através da sua hidroxilação na posição 6, seguida pela sua conjugação principalmente com sulfato (70%) e em menores quantidades com glicuronídeos (6%), é excretada como hidroximelatonina conjugada com sulfato (6-sulfatoximelatonina) na urina (Kopin et al., 1961).

A melatonina pode se ligar aos receptores de membrana e também atuar como modificadora de reações que ocorrem no interior das células, isso se deve em parte à característica anfipática de sua molécula. Os receptores para melatonina clonados até o momento MT1 e MT2, são receptores acoplados a proteína G sensíveis a toxina *pertussis*, que promovem a redução dos níveis de AMPc por inibir a adenil ciclase. Estes receptores possivelmente estão envolvidos em várias funções, tais como na

reprodução, no ritmo circadiano e na função retiniana. O receptor MT3 tem localização intracelular-citoplasmática, e é uma isoforma da enzima quinona redutase 2 (Reppert et al., 1995; Nosjean et al., 2000). Além disso, tem sido descrito receptores nucleares do tipo RZR/ROR para melatonina, que participam na expressão gênica de enzimas antioxidantes (Smirnov, 2001).

A melatonina possui reconhecidas funções hormonais e cronobiológicas e como função mais abrangente a melatonina ajusta a resposta do organismo às condições de escuro, permitindo que haja uma adaptação às atividades e desempenhos noturnos de cada animal. Porém, o que nos tem chamado à atenção na última década é a sua função neuroprotetora. Tem sido conferida a melatonina uma ação antioxidante, onde a mesma é capaz de retirar os radicais livres da célula, além de estimular a síntese de enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GRd) e ainda é capaz de inibir a enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Reiter, 1995; Hardeland, 2005). Além disso, a melatonina pode agir sinergicamente com outros antioxidantes conhecidos, tais como, vitamina E e ácido ascórbico (Cuzzocrea e Reiter, 2001).

Alguns autores têm mostrado que a melatonina exerce um efeito antiinflamatório, onde foi observado que a mesma inibe a adesão e o rolamento de neutrófilos nas células endoteliais (Lotufo et al., 2001), reduz a síntese da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e da ciclooxygenase induzida (COX 2) (Cuzzocrea e Reiter, 2001). O efeito antiinflamatório da melatonina parece estar diretamente relacionado à sua capacidade de bloquear a ativação do fator nuclear kappa β (NF κ β), que é a via comum na indução de iNOS e COX2 em processos inflamatórios (Mohan et al., 1995). Outro fator que tem despertado a atenção de pesquisadores é o efeito inibitório da melatonina sobre o sistema nervoso central. Em estudo experimental se demonstrou que a administração crônica de melatonina em ratas induz uma maior afinidade do GABA por seu receptor, sem com isso haver diminuição do número de receptores, aumentando a transmissão GABAérgica mediante a modulação da atividade do receptor GABA (Niles et al., 1987). Em estudo em fatias de medula espinhal, mostrou-se que a melatonina potencializa as correntes induzidas por GABA, diminuindo então a excitabilidade neuronal, contribuindo para os efeitos neuroprotetores da melatonina (Wu et al., 2001). Em paralelo, Escames et al., (2001)

demonstraram através de estudo neurofisiológico *in vitro* que a melatonina promove uma diminuição no influxo de cálcio para o interior da célula, resultando na diminuição da atividade glutamatérgica, diminuindo com isso a resposta excitatória neuronal.

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é uma síndrome específica, de alta incidência e gravidade, que se caracteriza pela presença de crises parciais simples e complexas em que muitos pacientes se mostram refratários aos anti-epilépticos disponíveis (Yacubian, 1998). O padrão anatômico patológico mais característico da ELT é a esclerose mesial temporal (EMT), que é mais comumente verificada em pacientes com crises epilépticas de difícil controle (Sano, 1997). A esclerose hipocampal inclui perda seletiva de células do hipocampo, gliose e reorganização sináptica com brotamento de fibras musgosas (Babb et al., 1987; Mathern et al., 2002). Para compreendermos melhor esta síndrome, os modelos experimentais *in vivo* são muito úteis, uma vez que reproduzem as características comportamentais, eletrográficas e histopatológicas da ELT humana e nos permitem trabalhar na ausência de drogas anti-epilépticas (Cavalheiro et al., 1991). Como modelos crônicos, que mimetizam a ELT, podemos mencionar o modelo da pilocarpina (Turski et al., 1983), o do ácido caínico (Ben-Ari et al., 1979), e o abrasamento (Goddard, 1967).

Em ratos adultos, após a administração intraperitoneal (i.p.) de pilocarpina na dose de 320-380 mg/kg, se desencadeia, seletivamente, uma seqüência de distúrbios convulsivos e eletroencefalográficos, que podem ser divididos em três fases comportamentais bastante distintas: aguda, silenciosa e crônica.

A fase aguda começa poucos minutos após a administração da droga e os animais evoluem para *status epilepticus* (SE) cerca de 40 minutos após a injeção, uma condição que dura de 12 a 18 horas. A fase silenciosa se estabelece após a recuperação clínica e comportamental do animal. Esta condição tem uma duração variável (4 - 44 dias) e termina com a ocorrência da primeira crise espontânea, que caracteriza a fase crônica do modelo. Nessa fase observa-se a presença de crises espontâneas e recorrentes de origem límbica, que se manifestam eletrograficamente por atividade paroxística, que se inicia principalmente no hipocampo e depois se propaga para o córtex e outras estruturas. É visto em estudo histopatológico que a região hipocampal é uma das estruturas mais lesionadas, evidenciando-se, já no final

da fase aguda, uma extensa degeneração das células piramidais hipocâmpais da região CA1 e CA3, assim como das células musgosas da região polimórfica do giro dentado (hilo) (Turski et al., 1983), permanecendo preservados os interneurônios GABAérgicos (Cavalheiro et al., 1990). O brotamento supragranular das fibras musgosas no giro dentado é característico do tecido epiléptico humano (Babb et al., 1991) e também é evidente na fase crônica deste modelo (Mello et al., 1993).

Um aumento na concentração de diferentes prostaglandinas foi observado em todas as três fases do modelo (Naffah-Mazzacoratti et al., 1995). Existe também uma participação dinâmica do sistema caliceína-cininas mediante seus receptores B1 e B2 de cininas. Argañaraz et al., (2004) mostraram um aumento do RNAm para receptores B1 e B2 no hipocampo nas três fases do modelo. Existem ainda várias evidências envolvendo as citocinas inflamatórias na patogênese da epilepsia. Tem sido descrito um aumento da imunoreatividade a IL-1 α em tecidos provenientes de ressecção cirúrgica de pacientes com ELT (Sheng et al., 1994) e um aumento da imunoreatividade a IL-1 β após crises induzidas pelo ácido cálcico (AC) no hipocampo de ratos. Além disso, tem sido observado um efeito pró-convulsivante direto dessas interleucinas (Vezzani et al., 1999).

Estes dados indicam que a excitotoxicidade, assim como a inflamação são fenômenos que podem influenciar a epileptogênese e que, inúmeros eventos estão associados à transformação de um neurônio normal em um neurônio epiléptico.

Janjoppi et al., (2006) demonstraram que animais pinealectomizados necessitam de um número reduzido de estímulos para atingir o estágio 5 (cinco) no modelo do abrasamento da amígdala. Por outro lado, o tratamento com melatonina em animais que foram submetidos à técnica do abrasamento na amígdala tem demonstrado um efeito anticonvulsivante, diminuindo a susceptibilidade para a indução de crises (Mevissem e Ebert, 1998). Além disso, tem sido relatado que a melatonina reduz os efeitos morfológicos, bioquímicos e comportamentais do AC (Sperk, 1994).

Evidências clínicas têm demonstrado que a melatonina em adição a outras terapias antiepilépticas exerce um papel anticonvulsivante, por reduzir as espículas no traçado eletroencefalográfico e também a frequência de crises em pacientes com epilepsia (Antón-Tay, 1974; Fauteck et al., 1999). Em adição, Bazil et al., (2000), observaram que em pacientes adultos com epilepsia do lobo temporal, os níveis

inter-ictais de melatonina estão significativamente diminuídos quando comparados com os pacientes controles. Por outro lado, após uma crise, se observa um aumento deste hormônio por um período de até 24 horas. Esse aumento poderia exercer uma proteção contra crises repetitivas, uma vez que a melatonina tem se mostrado capaz de diminuir a excitabilidade neuronal.

Nesse mesmo contexto, Maertens et al., (1995) demonstraram que o uso prolongado de drogas antiepilépticas aumenta a formação de radicais livres, o que causa dano oxidativo celular levando a morte neuronal. Observando as propriedades da melatonina como uma molécula antioxidante, Gupta et al., (2004) administraram melatonina para crianças em monoterapia com valproato (VPA) e observaram uma melhora na qualidade de vida dessas crianças quando comparadas com o grupo placebo no que se refere ao apetite, melhora na qualidade do sono, uma melhora na atenção, memória, linguagem e ansiedade. A esta melhora, os autores atribuem as propriedades da melatonina como uma molécula anticonvulsivante, antioxidante e ainda aos seus efeitos favoráveis sobre o sono.

Esses dados mostram que a melatonina de alguma maneira tem um importante papel neuroprotetor na epilepsia, porém os mecanismos pelos quais se dá essa neuroproteção não estão claros.

Em estudos realizados em nosso laboratório, foi verificado que animais pinealectomizados e submetidos ao modelo da pilocarpina apresentam uma piora no quadro epileptogênico. Por outro lado, verificou-se que o pré-tratamento com melatonina nestes animais protegeu os neurônios da morte celular por apoptose (TUNEL) na fase aguda do modelo, evidenciando seu papel neuroprotetor (Lima et al., 2005).

Além disso, verificamos também que animais pré-tratados com melatonina submetidos ao modelo da pilocarpina apresentam um aumento na latência para a ocorrência do SE, uma diminuição da frequência de crises durante o período crônico do modelo e uma sobrevida de 100% (Figura 1). Esses animais apresentaram ainda uma preservação celular hipocampal (fase crônica) como podemos observar na figura 2, uma diminuição no grau de brotamento das fibras musgosas (Figura 3) e um aumento na transmissão GABAérgica (fase aguda) (Lima et al., 2010; Trabalho submetido para publicação). Da mesma maneira, verificamos que animais tratados

com melatonina após o SE apresentaram uma diminuição na freqüência de crises no período crônico do modelo, uma diminuição no brotamento das fibras musgosas e uma preservação celular hipocampal (Lima et. al., 2010 - Trabalho submetido para publicação).

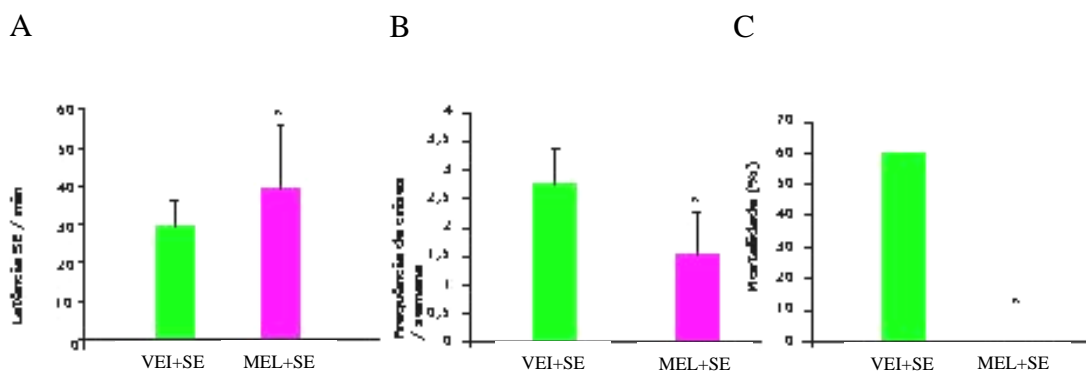


Figura 1. A. Latência para o SE em minutos ($p < 0,01$); B. Frequência de crises por semana ($p < 0,05$); C. Taxa de mortalidade ($p < 0,01$).

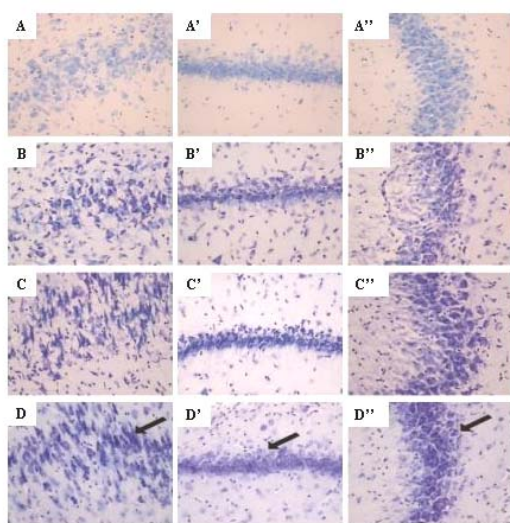
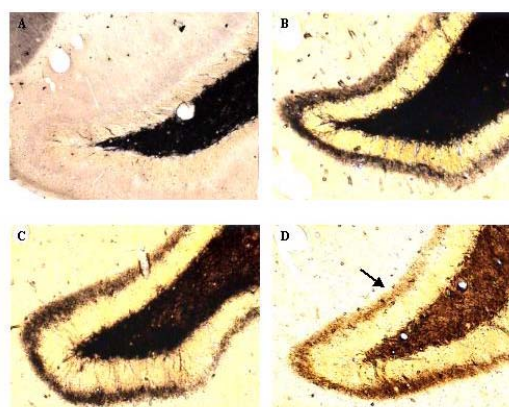


Figura 2. Fotomicrografias de secções coronais do hipocampo dorsal coradas pela técnica de Nissl. A-D: Giro Dentado, A'-D': CA1 e A''- D'': CA3. A: Grupo Salina, B: Grupo VEI+SE, C: Grupo NAS+SE, D: Grupo MEL+SE. Magnificação 400X. As setas mostram uma preservação celular nas regiões do Hilo, CA1 e CA3 para o grupo MEL+SE.

Figura 3. Fotomicrografias de secções coronais do hipocampo dorsal, coradas pela técnica de neo-Timm. A: Grupo Salina, B: Grupo VEI+SE, C: Grupo NAS+SE, D: Grupo MEL+SE. Magnificação 200X. A seta indica um menor grau de brotamento das fibras musgosas no grupo SE+MEL.



Sabemos que para prevenção ou tratamento das epilepsias, é fundamental a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessa síndrome e, portanto, mais estudos devem ser direcionados ao tema. Nossos dados mostram um envolvimento direto da melatonina na epilepsia.

Assim, acreditamos que a melatonina possa ser utilizada no tratamento das epilepsias, aumentando a eficácia de algumas drogas antiepilépticas ou diminuindo a toxicidade das mesmas, minimizando os efeitos do SE (excitotoxicidade/inflamação) ou ainda diminuindo as crises, mas de alguma maneira, melhorando a qualidade de vida dos pacientes com epilepsia.

REFERÊNCIAS

1. Anton-Tay F. Melatonin: Effects on brain function. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 1974; 11: 315-24.
2. Argañaraz GA; Perosa SR; Bader M; Cavalheiro EA; Naffah-Mazzacoratti MG; Pesquero JB; Silva Jr JA. Role of the kinin B1 and B2 receptor in the development of pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* 2004;1013(1):30-39.
3. Babb TL; Kupfer WR; Pretorius JK; Crandall PH; Levesque MF. - Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neurosci.*, 1991; 42:351-363.
4. Bazil CW; Short D; Crispin D; Zheng W. - Patients with intractable epilepsy have low melatonin, which increases following seizures. *Neurology*, 2000; 55: 1746-8.
5. Cavalheiro EA. GAD immunoreactive neurons are preserved in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures. *Braz J Med Biol Res.*, 1990; 23: 555-8.
6. Cuzzocrea S; Reiter RJ. - Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 2001; 426(1-2):1-10.
7. Escames G; Macias M; Leon J; Garcia J; Khaldy H; Matin M; Vives F; Acuna-Castroviejo D. Calcium-dependent effects of melatonin inhibition of glutamatergic response in rat striatum. *J. Neuroendocrinol.*, 2001;13(5): 459-66.
8. Fauteck JD, Schmidt H, Lerchl A, et al. Melatonin in epilepsy: first results of replacement therapy and first clinical results. *Biol Signals Recept.*, 1999; 8:105-110.
9. Gastaut H, Gastaut JL, Gonçalves e Silva GE, Fernandez Sanchez GR. Relative frequency of different types of epilepsy: A study employing the classification of the international league against epilepsy. *Epilepsia* 1975; 16:457-61.
10. Gupta M; Aneja S; Kohli K. Add-on melatonin improves quality of life in epileptic children on valproate monotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Epilepsy & Behavior*, 2004; 5:316-321.
11. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27:119-130.
12. Janjoppi L; Lacerda AFS; Scorza FA; Amado D; Cavalheiro EA; Arida RM. Influence of pinealectomy on the amygdala kindling development rats. *Neurosci. Lett.*, 2006; 392(1-2):73-78.
13. Kopin IJ; Pare CM; Axelrod J; Weissbach H. - The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem.* 1961; 236:3072-5.
14. Lima E; Soares JM; Garrido YCS; Valente SG; et al. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats. *Brain Res*, 2005;1043(1-2):24-31.
15. Eliângela Lima; Francisco R. Cabral; Sandra R. Perosa; Esper A. Cavalheiro; Maria da Graça Naffah-Mazzacoratti; Débora Amado. Could Melatonin treatment during pilocarpine-induced *status epilepticus* prevents or attenuates post lesion? submetido ao *Epilepsy & Behavior*, 2010.
16. Lotufo CMC; Lopes C; Dubocovich ML; Farsky SHP; Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Europe Journal Pharmacol.*, 2001; 430:351-357.

17. Maertens P; Dyken P; Pippenger C; Chronister R; Shah A. Free radicals, anticonvulsants, and the neuronal ceroid-lipofuscinoses. *Am J Med Genet.*, 1995; 57(2): 225-8.
18. Mello LE; Cavalheiro EA; Tan AM; Kupfer WR; Pretorius JK; Babb TL. Finch D.M. Circuit mechanism of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: Cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, 1993; 34: 985-995.
19. Mevissen M; Ebert U. Anticonvulsant effects of melatonin in amigdala-kindled rats. *Neurosci Lett*, 1998; 257:1, 13-16.
20. Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-Kappa β . *Biochem Mol Biol Int.*, 1995; 37(6):1079-89.
21. Naffah-Mazzacoratti MG; Belissimo MI; Cavalheiro EA. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem. Int.* 1995; 27 (6), 461-466.
22. Niles LP; Pickering DS, Arciszewski MA. - Effects of chronic melatonin administration of GABA and diazepam binding in rat brain. *J Neural Trans*, 1987; 70:117-24.
23. Nosjean O; Nicolas JP; Klupsch F, Delagrangé P; Canet E; Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol.*, 2001; 61(11):1369-79.
24. Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol*, 1991; 79:C153-8.
25. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Fedn. Am. Socs. Exp. Biol.* 1995; J. 9, 526-533.
26. Reppert SM; Weaver DR; Cassone VM; Godson C; Kolakowski LE Jr. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two Receptor subtypes Differentially expressed in chick brain. *Neuron* 1995; 15:1003-1015.
27. Sheng JG; Bloop FA; Mark RE; Griffin WST. Increased neuronal B amyloid precursor protein expression in human temporal lobe epilepsy: association with interleukin -1 α immunoreactivity. *J Neurochem* 1994; 63:1872-1879.
28. Sperk G. Kainic acid seizures in the rat. *Prog. Neurobiol.* 1994; 42, 1-32.
29. Turski WA; Cavalheiro EA; Schwarcz M; Czuczwarz SJ; et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.*, 1983; 9:315-335.
30. Vezzani A; De Conti M; Luigi A; Ravizza T; Moneta D; Marchesi F; De Simoni MG. Interleukin -1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci.* 1999; 19:5054-5065.
31. Wu FS; Yang YC; Tsai JJ. Melatonin potentiates the GABA_A receptor-mediated current in cultured chick spinal neurons. *Neurosci. Lett.*, 1999; 260: 177-80.
32. Yacubian EMT. Epilepsias refratárias em adultos. *In: Costa JC. Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias: Aspectos clínicos e cirúrgicos.* São Paulo, Lemos Editorial, 1998; 807-816.

PAPEL NEUROPROTETOR DA ADENOSINA NA EPILEPSIA

da Silva-Fernandes MJ, Rosim FE, Ribeiro-Silva I, Persike DS, Cavalheiro EA.

Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Disciplina de Neurologia, Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil.

INTRODUÇÃO

Epilepsia é um distúrbio crônico da função cerebral caracterizado pela presença de crises epiléticas espontâneas e recorrentes que ocorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril, causando consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (Engel Jr., 2001).

Estudos de prevalência e incidência das epilepsias apresentam índices bastante variáveis: têm sido descritos valores de prevalência entre 0,9 e 57 casos/1.000 habitantes e de incidência entre 26 e 190 casos/100.000 habitantes. Essas variações podem ser resultantes de características metodológicas diversas: critérios diagnósticos e de classificação, métodos de seleção de casos e definições das epilepsias (Duncan et al., 2006). No Brasil, a prevalência das epilepsias é de 5,4/1.000 habitantes (Noronha et al., 2007).

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia na população adulta, representando cerca de 40% de todos os casos (Gastaut et al., 1975; Regesta e Tanganelli, 1999). A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) constitui aproximadamente 60% dos casos de ELT e acomete estruturas límbicas, particularmente a amígdala e o complexo hipocampal (French et al., 1993). Esta síndrome tem grande importância clínica e é alvo de intensa investigação científica devido à alta prevalência e refratariedade ao tratamento farmacológico (Engel Jr. et al., 1993).

A ELTM tem início na infância tardia ou adolescência, geralmente com história prévia de convulsão febril, hipóxia, trauma crânio-encefálico ou infecções do SNC (French et al., 1993). De uma maneira geral, caracteriza-se por crises parciais simples, complexas ou com generalização secundária (Cendes e Kobayashi, 2000), sendo as crises parciais complexas o tipo predominante e incapacitante (French et al., 1993).

A esclerose hipocampal é a alteração anatomopatológica mais frequentemente encontrada (65%) na ELT refratária ao tratamento farmacológico (Babb et al., 1984; Mathern et al., 1996). Ela é caracterizada por perda neuronal e gliose, especialmente das células de CA1, CA3 e hilo do giro denteado, resultando em cicatrização e atrofia tecidual (Babb et al., 1984; Blumcke et al., 1999). Além disso, há reorganização sináptica proveniente de brotamentos axonais das células granulares (fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado (Babb et al., 1991).

As alterações estruturais observadas no complexo hipocampal podem estar criticamente envolvidas com o processo epileptogênico (Engel Jr., 1996). Uma forte evidência é que a remoção cirúrgica da formação hipocampal e da amígdala resulta em uma melhora considerável ou remissão das crises em grande parte dos pacientes.

A alta incidência de refratariedade ao tratamento farmacológico na ELT, bem como o seu impacto na vida do indivíduo e na sociedade, tem compelido pesquisadores no mundo todo a estudar a sua fisiopatologia, o que torna os modelos experimentais de epilepsias particularmente relevantes.

A contribuição dos modelos experimentais de epilepsias tem sido imprescindível para a elucidação do fenômeno epileptogênico. O modelo da pilocarpina é amplamente utilizado por reproduzir as principais características fenomenológicas da ELT humana (Turski et al., 1983).

Neste modelo, o estado de mal epiléptico resultante da intensa ativação colinérgica causada pela pilocarpina, resulta na ativação de receptores glutamatérgicos pelo glutamato liberado no hipocampo e em outras áreas do sistema nervoso central, levando a um aumento na concentração intracelular de íons cálcio (Ca^{2+}). O cálcio em altas concentrações na célula irá ativar várias cascatas como caspases, lipases e

endonucleotidasas, podendo causar a morte da célula (DeLorenzo et al., 2005; DeLorenzo e Sun, 2006). As consequências do SE prolongado são, portanto, morte neuronal por apoptose, por necrose, processo inflamatório, neurogênese e reorganização sináptica (Silva e Cavalheiro, 2004).

Estudos recentes têm buscado elucidar mecanismos capazes de bloquear ou reduzir os processos de morte neuronal ativados por crises. Nesse contexto a adenosina tem apontado como um importante agente neuroprotetor.

ADENOSINA

A adenosina é uma molécula da classe das purinas que está envolvida na modulação de uma variedade de importantes processos fisiológicos no SNC e em órgãos periféricos (Dunwiddie e Masino, 2001; Boison, 2006).

Há uma dinâmica regulação dos níveis de adenosina no SNC. Suas concentrações basais nos meios intra e extracelulares dependem do equilíbrio entre os mecanismos de síntese, liberação, recaptção e degradação (Dunwiddie e Masino, 2001; Latini e Pedata, 2001).

Em condições fisiológicas, a concentração basal de adenosina é relativamente baixa, tanto no meio intracelular (entre 10 e 50 nM) (Cunha, 2005) quanto no meio extracelular (entre 30 e 300 nM) (Fredholm et al., 1999; Dunwiddie e Masino, 2001). Entretanto, seus níveis no espaço extracelular podem aumentar drasticamente em condições patológicas, tais como: isquemia, crises ou traumas (Benarroch, 2008). Nestas condições, a concentração de adenosina no fluido extracelular pode atingir valores iguais ou superiores a 10 μ M (Fredholm et al., 2001; Schulte e Fredholm, 2003).

A adenosina é sintetizada a partir da hidrólise do monofosfato de adenosina (AMP) nos meios intra e extracelulares, através da ação de uma família de enzimas conhecidas como 5'-nucleotidasas. Nos tecidos de mamíferos, há quatro diferentes formas destas enzimas descritas. Elas apresentam propriedades moleculares e bioquímicas distintas, sendo duas ectoenzimas, presentes no fluido extracelular, e duas enzimas citosólicas (Figura 1) (Zimmermann, 1992).

A produção de adenosina no meio extracelular pode ocorrer através do metabolismo rápido de nucleotídeos de adenina, como o trifosfato de adenosina (ATP) e o

difosfato de adenosina (ADP), que são hidrolisados pelas enzimas ecto-nucleotídeo-trifosfato-difosfohidrolases (e-NTPDases), ou através do metabolismo do AMP, pela ação da enzima ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 2001).

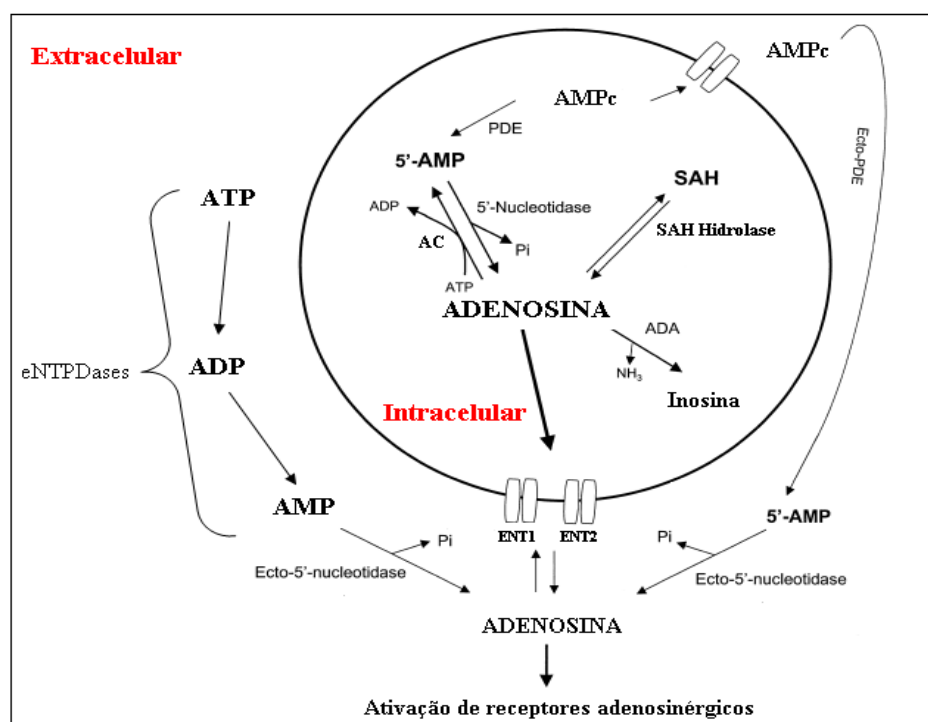


Figura 1. Vias de síntese, recaptação e degradação da adenosina. Nota: AMPc (monofosfato cíclico de 3',5'-adenosina); 5'-AMP (monofosfato de 5'-adenosina); ADP (difosfato de adenosina); ATP (trifosfato de adenosina); ENT1 e ENT2 (transportadores equilibradores de nucleosídeos); e-NTPDases (enzimas ecto-nucleotídeo-trifosfato-difosfohidrolases); PDE (enzima fosfodiesterase); SAH (S-adenosilhomocisteína); ADA (enzima adenosina desaminase); AC (enzima adenosina cinase); Pi (fosfato inorgânico). Adaptado de: Latini e Pedata, 2001.

A produção de adenosina no meio extracelular pode ocorrer através do metabolismo rápido de nucleotídeos de adenina, como o trifosfato de adenosina (ATP) e o difosfato de adenosina (ADP), que são hidrolisados pelas enzimas ecto-nucleotídeo-trifosfato-difosfohidrolases (e-NTPDases), ou através do metabolismo do AMP, pela ação da enzima ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 2001).

Estudos por imunoblotting e hibridização in situ revelaram a presença das enzimas e-NTPDases 1, 2 e 3 no cérebro de mamíferos (Kukulski et al., 2005; Vorhoff et al., 2005; He et al., 2005). As e-NTPDases 1 hidrolisam o ATP e o ADP na mesma velocidade e proporção (Heine et al., 1999). As e-NTPDases 2 possuem uma

preferência 30 vezes maior pela hidrólise do ATP. As e-NTPDases 3 hidrolisam o ATP e o ADP com uma razão de 3:1 (Zimmermann, 2001; Kukulski et al., 2005).

Outra possível fonte de adenosina extracelular é a proveniente do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), que é carregado para fora da célula por um transportador não específico dependente de energia. No meio extracelular, o AMPC é convertido em AMP pela enzima ecto-fosfodiesterase (Ecto-PDE) (Henderson e Strauss, 1991).

A adenosina ainda pode ser formada a partir da Sadenosilhomocisteína (SAH), em uma reação de hidrólise catalisada pela enzima SAH hidrolase, que está presente no fluido intracelular (Latini e Pedata, 2001).

Os níveis intra e extracelulares de adenosina são mantidos em equilíbrio através de transportadores específicos de nucleosídeos, que são classificados em duas categorias: (1) Transportadores concentradores de nucleosídeos, que medeiam o influxo de adenosina na célula contra a gradiente de concentração e (2) Transportadores equilibradores de nucleosídeos, que carregam a adenosina em ambas as direções, seguindo a gradiente de concentração. Este último é o tipo predominante no SNC (Latini e Pedata, 2001).

Após ser recaptada do meio extracelular pelos transportadores específicos, a adenosina pode ter três destinos diferentes: ser fosforilada a AMP, pela ação da enzima adenosina cinase (AC); sofrer degradação à inosina, pela atividade da enzima adenosina desaminase (ADA) (Hack e Christie, 2003); ou ser metabolizada à S-adenosilhomocisteína (SAH), via uma reação reversível catalisada pela enzima SAH hidrolase (Dunwiddie e Masino, 2001; Latini e Pedata, 2001).

As ações da adenosina são mediadas via receptores purinérgicos do tipo P1, pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G. Até o momento, quatro subtipos foram clonados e caracterizados: A1, A2A, A2B e A3, os quais se diferenciam pelo tipo de proteína G e pela transdução de sinais que desencadeiam (Tabela 1) (Fredholm et al., 2000; Dunwiddie e Masino, 2001; Benarroch, 2008).

De uma maneira geral, os receptores A1 e A3 interagem com proteínas G inibitórias (Gi), promovendo inibição da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, diminuição dos níveis de AMPC. Já os receptores A2A e A2B estão acoplados a proteínas G estimulatórias (Gs), e ativam a adenilato ciclase, aumentando o AMPC

(Fredholm et al., 2001). No entanto, os receptores adenosinérgicos também podem interagir com outros tipos de proteínas G, sinalizando vias independentes da adenilato ciclase, como demonstrado na tabela 1 (Cunha, 2005).

A adenosina apresenta alta afinidade pelos receptores A1, A2A e A3 e baixa afinidade pelo A2B. Dentre esses receptores, A1 e A2A são os mais abundantes no SNC, onde estão envolvidos na maioria das atividades fisiológicas. Já os receptores A2B e A3 têm baixa expressão no SNC e podem ser relevantes em alguns processos patológicos (Ribeiro et al., 2003).

Tabela 1. Caracterização dos receptores adenosinérgicos quanto ao tipo de proteína G e transdução de sinais.

SUBTIPO	PROTEÍNA G	EFETORES BIOQUÍMICOS
A ₁	G _{i1/2/3}	↓ AMPc ↑ Canais de K ⁺ ↓ Canais de Ca ²⁺ ↑ IP3 / PLC ↑ PLA2 / PLD
	G _o	-----
A _{2A}	G _s	↑ AMPc
	G _{olf}	↑ AMPc
	G _{15/16}	↑ IP3
A _{2B}	G _s	↑ AMPc
	G _{q/11}	↑ IP3 e PLC
A ₃	G _{i 2/3}	↓ AMPc ↑ IP3 / PLC ↑ PLD ↑ Canais de K ⁺ e de Cl ⁻
	G _{q/11}	↑ IP3 / PLC

Nota: AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; K⁺: íon potássio; Ca²⁺: íon cálcio; IP3: inositol 1,4,5-trifosfato; PLC: fosfolipase C; PAL2: fosfolipase A2; PLD: fosfolipase D; Cl⁻: íon cloro. Adaptado de: Fredholm et al., 2001; Schulte e Fredholm, 2003.

Os receptores A2A apresentam uma menor distribuição no SNC, em comparação aos receptores A1. Eles são predominantemente expressos no estriado, particularmente em neurônios gabaérgicos estriatopalidais e em terminais glutamatérgicos corticoestriatais (Cunha, 2005; Benarroch, 2008).

Entretanto, esses receptores também são encontrados em outras regiões cerebrais, incluindo o neocórtex, núcleo do trato solitário, hipocampo e tálamo, embora com níveis de expressão menores (Ribeiro et al., 2003). Da mesma forma que A₁, o receptor A_{2A} está presente em neurônios, astrócitos, micróglia e oligodendrócitos. El também é encontrado nos vasos sanguíneos cerebrais (Benarroch, 2008).

A figura (2) a seguir ilustra a distribuição dos receptores A₁ e A_{2A} no SNC de rato.

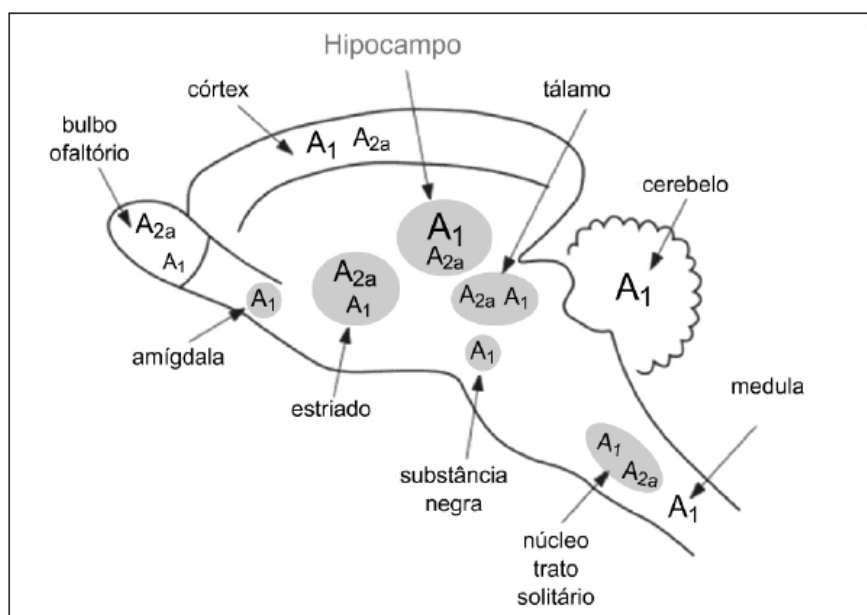


Figura 2. Distribuição dos receptores adenosinérgicos A₁ e A_{2A} em diferentes regiões do sistema nervoso central de rato. Adaptado de: Ribeiro et al., 2003.

Os receptores A_{2B} e A₃ apresentam níveis de expressão extremamente baixos no SNC. O receptor A_{2B} é encontrado em neurônios de CA1 e CA3, bem como em células da glia. Já o receptor A₃ tem baixa densidade no hipocampo e cerebelo (Dixon et al., 1996).

A ativação de receptores A₁ está relacionada com a maioria das funções inibitórias que a adenosina exerce no SNC (Ribeiro et al., 2003; Benarroch, 2008).

Em contrapartida, o receptor A_{2A} é responsável por mediar ações excitatórias da adenosina no SNC, estando envolvido com processos de locomoção, ansiedade, agressão, motivação e reforço nas drogas de abuso, e comportamentos psicóticos (Ledent et al., 1997; Moreau e Huber, 1999; Chen et al., 2000). Além disso, esses

receptores estão envolvidos no controle do fluxo sanguíneo cerebral (Ralevic e Burnstock, 1998).

ADENOSINA E EPILEPSIA

A adenosina atua como um neuromodulador no SNC, com efeitos predominantemente inibitórios sobre a atividade neuronal. Desta forma, ela tem se destacado como um importante agente anticonvulsivante endógeno (Dunwiddie e Masino, 2001; Fredholm et al., 2001; Pagonopoulou et al., 2006). Estudos de microdiálise demonstram que os níveis extracelulares de adenosina aumentam no hipocampo durante o período ictal, tanto em modelos experimentais como em pacientes com crises parciais complexas refratárias ao tratamento farmacológico, e este aumento tem sido proposto como um mecanismo intrínseco no controle das crises (During e Spencer, 1992; Pagonopoulou et al., 2006).

Inúmeras evidências sugerem que o efeito inibitório da adenosina sobre a atividade de crises é mediado, principalmente, por ativação de receptores A1 (Dunwiddie, 1999b; Dunwiddie e Masino, 2001; Fredholm, 2005).

Os receptores A1 são altamente expressos no hipocampo, e localizam-se em especializações neuronais pré e pós-sinápticas. A ativação desses receptores pré-sinápticos modula a transmissão sináptica excitatória, por diminuir a liberação de glutamato, através da inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes. Em paralelo, a ativação dos receptores pós-sinápticos, deprime a excitabilidade neuronal, por aumentar a condutância da membrana aos íons potássio (K^+), hiperpolarizando a célula (Ongine e Schubert, 1998; Dunwiddie e Masino, 2001).

Além da ação anticonvulsivante, a adenosina tem sido reconhecida como um agente neuroprotetor em modelos experimentais de epilepsia (MacGregor e Stones, 1993; Vianna et al., 2005; Silva et al., 2008).

Os mecanismos que levam à neuroproteção ainda são pouco conhecidos. Porém, a ativação de receptores A1 diminui a liberação de glutamato, inibe os receptores NMDA e hiperpolariza a membrana neuronal.

Esses efeitos são determinantes para a manutenção da homeostase intracelular de Ca^{2+} e, desta forma, podem proteger a célula nervosa contra danos excitotóxicos

(Figura 3) (Ongine e Schubert, 1998; De Mendonça et al., 2000; Wardas, 2002; Benarroch, 2008).

O papel benéfico do receptor A1 na epilepsia foi evidenciado através da manipulação farmacológica de agonistas deste receptor nos seguintes modelos experimentais: ácido caínico (MacGregor e Stones, 1993), ácido 3- nitropropilônico (Zuchora et al., 2005), pilocarpina (Vianna et al., 2005; Silva et al., 2008), pentilenotetrazol (Adami et al., 1995), abrasamento do córtex piriforme (Zeraati et al., 2006), e crises audiogênicas (De Sarro et al., 1999).

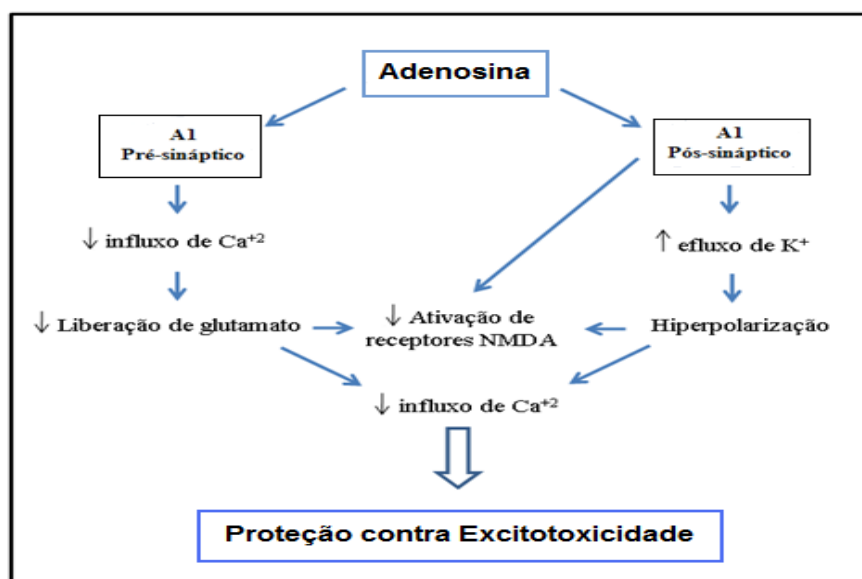


Figura 3. Representação esquemática de possíveis mecanismos responsáveis pela neuroproteção mediada por ativação do receptor adenosinérgico A1. Adaptado de: Wardas, 2002.

Os receptores A2A estão presentes no hipocampo, principalmente em terminais nervosos glutamatérgicos, favorecendo a liberação de glutamato (Cunha, 2005). Nos terminais pré-sinápticos, os receptores A2A podem estar co-localizados com receptores A1, de modo que a ativação de A2A atenua os efeitos inibitórios mediados por A1 (De Mendonça et al., 2000; Cunha, 2005).

Estudos mostram que os receptores A2A podem estar presentes na membrana pós-sináptica de neurônios hipocâmpais, favorecendo a despolarização dessas células (Li e Henry, 1998).

Além disso, a ativação do receptor A2A pode estimular micróglia e astrócitos, causando liberação de citocinas e aumentando o estresse oxidativo e a inflamação (Wardas et al., 2002). Desta forma, esta ativação pode contribuir para a

neurotoxicidade, dano neuronal e morte da célula (De Mendonça et al., 2000). Sendo assim, o bloqueio dos receptores A_{2A} pode ser uma estratégia de neuroproteção (Figura 4) (Wardas, 2002; Cunha, 2005; Benarroch, 2008).

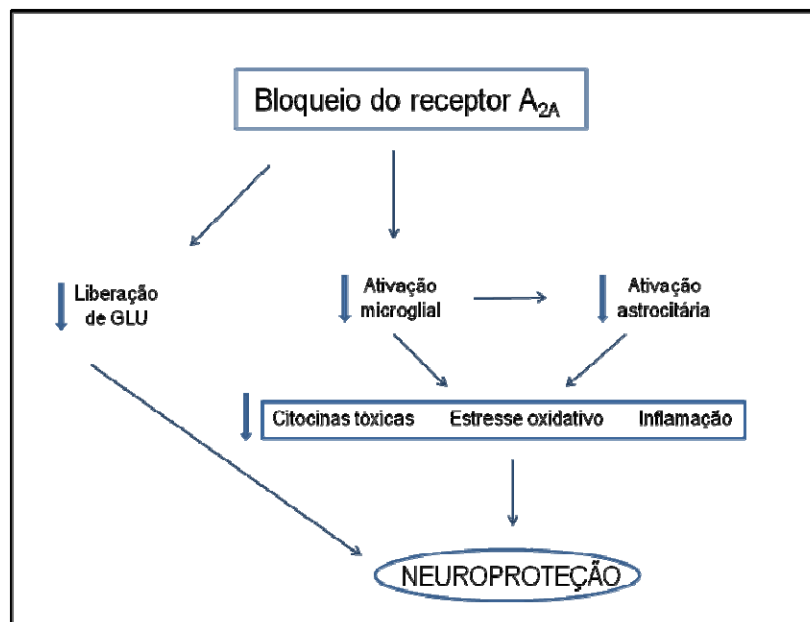


Figura 4. Representação esquemática de possíveis mecanismos responsáveis pela neuroproteção mediada por bloqueio farmacológico do receptor adenosinérgico A_{2A}. Nota: GLU: glutamato. Adaptado de: Wardas, 2002.

Contrariamente aos inúmeros estudos com o receptor A₁ na epilepsia, há uma escassa investigação sobre o papel do receptor A_{2A} na epilepsia, e os resultados dos estudos são controversos (Wardas, 2002; Boison, 2005; 2007).

A ativação do receptor A_{2A} pelo agonista seletivo (2-[p-(2-carboxyethyl) phenylethylamino]-5'-N-ethyl-carboxamidoadenosine) (CGS 21680) não impediu o aparecimento de crises motoras induzidas pela bicuculina, porém reduziu a severidade das crises (Zhang et al., 1994). Em contrapartida, o uso deste agonista impediu o desenvolvimento de crises audiogênicas em camundongos geneticamente susceptíveis a convulsões (De Sarro et al., 1999).

Estudos com o agonista 5'-(N-cyclopropyl) carboxamidoadenosine (CPCA) também mostraram resultados conflitantes. A utilização deste composto não impediu o desenvolvimento de crises agudas induzidas por pentilenotetrazol (Malhotra e Gupta, 1997), entretanto, suprimiu crises audiogênicas em ratos geneticamente sensíveis à epilepsia reflexa (Hubber et al., 2002).

O bloqueio de receptores A2A pelos antagonistas 3,7-dimethyl-1-propylxanthine (DMPX), 8-(3-Chlorostyryl) caffeine (CSC), 7-methyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3-dipropylxanthine (KF17837), 5-amino-7-(2-phenylethyl)-2(2-furyl)-pyrazolo-(4,3-c)1,2,4-triazolo(1,5-c)-pyrimidine (SCH58261) e cafeína, previamente a estímulos audiogênicos subconvulsivantes, aumentou a incidência de crises clônicas e tônicas (De Sarro et al., 1999). A administração do antagonista DMPX aumentou o número de animais em SE no modelo da pilocarpina (Vianna et al., 2005). Em oposição, o antagonista seletivo SCH58261 preveniu crises no modelo do ácido caínico (Porciúncula et al., 2004) e da pilocarpina, porém não alterou o quadro de lesão em ratos tratados com pilocarpina (Rosim et al., 2009). Os antagonistas ZM241385 ou CSC reduziram a extensão do dano neuronal em regiões hipocâmpais de roedores tratados com ácido caínico, ácido quinolínico e ácido quinurênico (Jones et al., 198; Stone e Behan, 2000). De uma maneira geral, os antagonistas de receptores A2A exercem um efeito neuroprotetor discreto em modelos de epilepsia, embora esse efeito seja potente em modelos de isquemia e hipóxia (Chen et al., 1999).

O papel dos receptores A3 nos mecanismos envolvidos com a epileptogênese é muito explorado. Os receptores A3 estão presentes nos astrócitos e parecem modular a liberação de citocinas (Miller et al., 2008). O pré-tratamento com o antagonista A3 MRS 1220 em ratos submetidos ao modelo da pilocarpina reduziu a latência para o aparecimento do SE, mas não alterou o número de células apoptóticas no hipocampo (Vianna et al., 2005).

Esses receptores parecem participar de processos de migração microglial juntamente com receptores P2Y, desempenhando um papel importante na regulação da liberação e ação das quimiocinas (Chen et al., 2006; Miller et al., 2008). As células gliais desempenham um papel importante no acoplamento da função neuronal a microvasculatura cerebral que controla o fluxo sanguíneo cerebral (Iadecola e Nedergaard, 2007; Koehler et al., 2009). A adenosina é um potente vasodilatador e esta diretamente envolvida com esse acoplamento entre fluxo sanguíneo e ativação neuronal. A vasodilatação de arteríolas corticais após aplicação tópica de glutamato pode ser revertida por antagonistas A2A e A2B, mas não pela inibição da sintetase do óxido nítrico, ciclooxigenase 2 ou citocromo P-450 epoxigenase (Boison, 2010).

Adenosina esta também envolvida com a propagação de cálcio em redes astrocíticas e este efeito é mediado pelo receptor A2B (77 Boison 2010). Recente estudo mostrou que a aplicação do agonista A1 R-Pia a ratos tratados com pilocarpina, causa aumento no fluxo sanguíneo e redução no consumo de glicose cerebral local em áreas límbicas envolvidas com a circuitaria das crises (Silva et al., 2005). Um menor número de células coradas com fluorojade B, um marcador fluorescente de morte celular, foi observado no hipocampo dos ratos em diferentes períodos após o início do SE, indicando que esta redução no desacoplamento entre fluxo sanguíneo e metabolismo de glicose pode representar um mecanismo de neuroproteção após crises induzidas por pilocarpina (ver Fig. 5 e 6). Embora o efeito anti-excitotóxico do R-Pia ocorra principalmente pela inibição da liberação do glutamato pela ativação de receptores A1, não podemos desconsiderar que o R-Pia possa promover glioproteção e conseqüentemente reduzir o desequilíbrio entre aporte energético e consumo de glicose durante a crise, contribuindo para a neuroproteção.

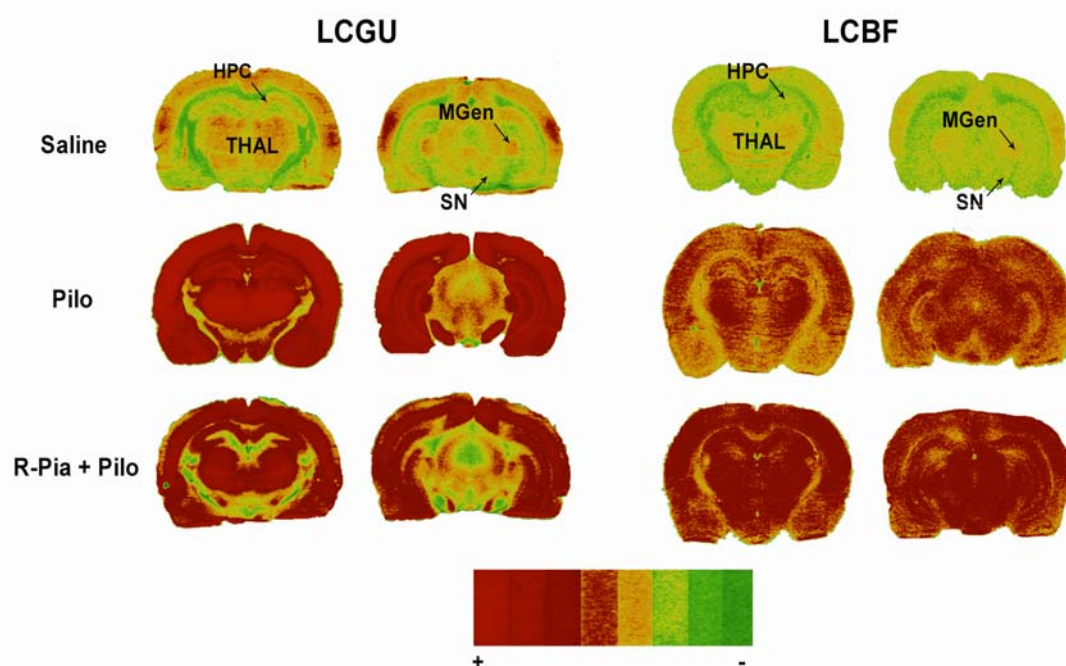


Figura 5: Auto-radiogramas mostrando utilização de glicose cerebral local (LCGU, método da [14C]2-desoxiglicose) e de fluxo sanguíneo cerebral local (LCBF, método da [14C]-Iodoantipirina) em seções coronais de cérebros de ratos adultos tratados com salina, pilocarpina (Pilo) e pilocarpina precedido de agonista adenosinérgico A1 (R (-) N6-(2-phenylisopropyl) adenosine) (R-Pia). Notar hipometabolismo (LCGU) na substancia negra, hipocampo e geniculado medial no grupo R-Pia + Pilo, hiperfluxo nas mesmas regiões (LCBF).

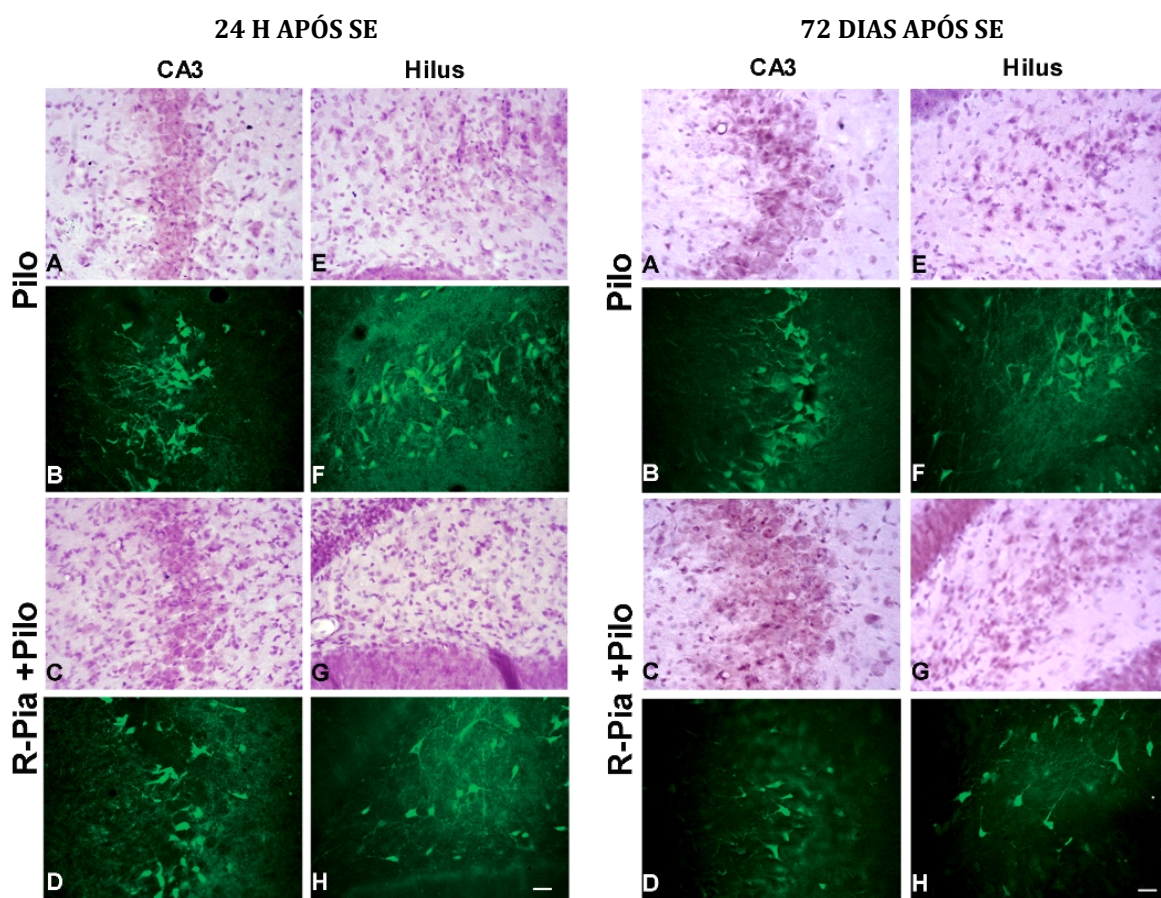


Figura 6. Histoquímica por Fluoro Jade B (B, F, D, H) e coloração com cresil violeta (A, E, C, G) em CA3 e hilo do giro dentado 24h e 7 dias após a indução do SE pela pilocarpina em ratos do grupo Pilo e R-Pia+Pilo. Notar neuroproteção em CA3 e hilo do grupo R-Pia. Cortes coronais de encéfalo com 40 μ m em vibrátomo.

Camundongos deficientes de adenosina cinase são mais resistentes ao processo lesional induzido por crises do que camundongos transgênicos que superexpressam adenosina cinase (Li et al., 2008). A astrogliose está presente no cérebro epiléptico e contribui para a geração de crises por meio de vários mecanismos. A localização espaço-temporal de astrogliose, aumento na expressão de adenosina cinase e ocorrência de crise eletrencefalografica em modelo experimental com crises restritas a essa área comprometida, foram as principais evidências que levaram o autor a propor tal hipótese. Além desse estudo, abordagens *in vitro* também deram suporte para indicar a participação de distúrbios na adenosina cinase na geração das crises (Etherington et al., 2009). A aplicação de técnicas de terapia gênica com implante intracerebral de células capazes de liberar adenosina tem sido apontada como nova abordagem terapêutica para o tratamento das epilepsias lesionais com

crises refratárias ao tratamento medicamentoso, mas os testes estão em fase experimental.

Esta revisão mostra a complexidade do sistema adenosinérgico e que são necessários muitos estudos para elucidar o papel da adenosina na epileptogênese.

REFERENCIAS

1. Adami M, Bertorelli B, Ferri N, Foddi MC, Ongini E. Effects of repeated administration of selective adenosine A1 and A2A receptor agonists on pentylenetetrazole-induced convulsions in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1995; 294: 383-389.
2. Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience.* 1991; 42(2): 351-63.
3. Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J, Crandall PH. Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia.* 1984; 25(6): 721-8.
4. Benarroch EE. Adenosine and its receptors. Multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology.* 2008; 70:231-236. Blumcke I, Zschratte W, Schewe JC, Suter B, Lie AA, Riederer BM. Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis. *J Comp Neurol.* 1999; 414(4):437-53.
5. Boison D. Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist.* 2005; 11: 25-36.
6. Boison D. Adenosine-based cell therapy approaches for pharmacoresistant epilepsies. *Neurodegenerative Dis.* 2006; 117-T1:1-6
7. Boison D. Adenosine as a modulator of brain activity. *Drug News Persp.* 2007;20:607-611.
8. Boison D. The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis. *Prog Neurobiol* 2008; 84: 249-262.
9. Boison D.; Chen J-F; Fredholm BB. Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell death differentiation*, 2010; 17:1071-1082.
10. Cendes F, Kobayashi E. *Epilepsia do Lobo Temporal.* Epilepsia. 2 ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2000 P. 201-13.
11. Chen JF, Huang Z, Ma J, Moratalla R, Standaert D, Moskowitz MA, Fink JS, Schwarzschild MA. A2A adenosine receptors deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci.* 1999; 19: 9192-9200.
12. Chen JF, Beilstein M, Xu YH, Turner TJ, Moratalla R, Standaert DG, Aloyo VJ, Fink JS, Schwarzschild MA. Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A2A adenosine receptors. *Neuroscience.* 2000; 97(1): 195-204.
13. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006; 314: 1792-1795.
14. Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signal.* 2005; 1(2):111-34.
15. De Mendonça A, Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 33(2-3): 258-74.
16. De Sarro G, De Sarro A, Di Paola ED, Bertorelli R. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on audiogenic seizure-sensible DBA/2 mice. *Eur J Pharmacol.* 1999; 371 (2-3): 137-45.
17. DeLorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther.* 2005; 105(3): 229-66.
18. DeLorenzo RJ, Sun DA. Basic mechanisms in status epilepticus: role of calcium in neuronal injury and the induction of epileptogenesis. *Adv Neurol.* 2006; 97: 187-97.
19. De Mendonça A, Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 33(2-3): 258-74.
20. Dixon AK, Gubitck AK, Siriinathsinhji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br Pharmacol.* 1996; 118:1461-1468.
21. Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet.* 2006; 367(9516):1087-100.

22. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Ann Rev Neurosci.* 2001; 24:31-55.
23. During MJ, Spencer DD. Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol.* 1992; 32:618-24.
24. Engel J Jr. International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2001a; 42(6): 796-803.
25. Engel J Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1996; 26(1): 141-50. Engel J Jr. Recent advances in surgical treatment of temporal lobe epilepsy. *Acta Neurol Scand.* 1992; 140: 71-80.
26. Etherington LA, Patterson GE, Meechan L, Boison D, Irving AJ, Dale N et al. Astrocytic adenosine kinase regulates basal synaptic adenosine levels and seizure activity but not activity-dependent adenosine release in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2009; 56: 429-437.
27. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999; 51: 83-133.
28. Fredholm BB, Chen JF, Masino SA, Vaugeois JM. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 385-412.
29. Fredholm BB, Ljzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology XXV Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 527-552.
30. French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: Results of history and physical examination. *Ann Neurol.* 1993; 34(6): 774-80.
31. Gastaut H, Gastaut JL, Gonçalves e Silva GE, Fernandez Sanchez GR. Relative frequency of different types of epilepsy: a study employing the classification of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.* 1975; 16(3): 457-61.
32. Hack SP, Christie MJ. Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. *Crit Rev Neurobiol.* 2003; 15(3-4):235-74.
33. He ML, Gonzales-Iglesias AE, Tomic M, Stojilkovic SS. Release and extracellular metabolism of ATP by ectonucleotidase eNTPDase 1-3 in hypothalamic and pituitary. *Purinergic Signal.* 2005; 1(2): 135-44.
34. Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem.* 1999; 262(1): 102-7.
35. Henderson GB, Strauss BP. Evidence for cAMP and cholate extrusion in C6 rat glioma cells by a common anion efflux pump. *J Biol Chem.* 1991; 266: 1641-1645.
36. Huber A, Güttinger M, Möhler H, Boison D. Seizure suppression by adenosine A2A receptor activation in a rat model of audiogenic brainstem epilepsy. *Neurosci Lett.* 2002; 329(3): 289-92.
37. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1369-1376.
38. Jones P.A., Smith R.A., Stone T.W.: Protection against kainate-induced excitotoxicity by adenosine A2A receptor agonists and antagonists. *neuroscience*, 1998, 85, 229-237.
39. Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* 2009; 32: 160-169.
40. Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie ÉG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDase 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling.* 2005; 1: 193-204.
41. Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 2001; 79(3): 463-84.
42. Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2A receptor. *Nature.* 1997; 388(6643): 674-678.
43. Li H, Henry JL. Adenosine A2A receptor mediation of pre- and postsynaptic excitatory effects of adenosine in rat hippocampus in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1998; 347: 173-82.
44. Li T, Ren G, Lusardi T, Wilz A, Lan JQ, Iwasato T et al. Adenosine kinase is a target for the prediction and prevention of epileptogenesis in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 571-582.
45. MacGregor DG, Stones TW. Inhibition by adenosine analogue, (R)-N6-phenylisopropiladenosine, of kainic acid neurotoxicity in rat hippocampus after systemic administration. *Br J Pharmacol.* 1993; 109: 316-321.

46. Malhotra J, Gupta YK. Effect of adenosine receptor modulation on pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Br J Pharmacol.* 1997; 120: 282-8.
47. Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res.* 1996; 26(1): 151-61.
48. Miller RJ, Rostene W, Apartis E, Banisadr G, Biber K, Milligan ED et al. Chemokine action in the nervous system. *J Neurosci* 2008; 28: 11792-11795.
49. Moreau JL, Huber G. Central adenosine A2A receptors: an overview. *Brain Res.* 1999; 31: 65-82.
50. Noronha AL, Borges MA, Marques LH, Zanetta DM, Fernandes PT, de Boer H, Espíndola J, Miranda CT, Prilipko L, Bell GS, Sander JW, Li LM. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. *Epilepsia.* 2007; 48(5): 880-5.
51. Ongini E, Schubert P. Neuroprotection induced by stimulating A1 or blocking A2A adenosine receptors: an apparent paradox. *Drug Dev Res.* 1998; 45: 387-93.
52. Pagonopoulou O, Efthimiadou A, Asimakopoulos B, Nikolettos NK. Modulatory role of adenosine and its receptors in epilepsy: possible therapeutic approaches. *Neurosci Res.* 2006; 56: 14-20.
53. Porciúncula LO, Canas P, Oliveira CR, Cunha RA. Blockade of adenosine A2A receptors prevents kainate-induced convulsions and neuronal cell death. 4th International Symposium of Nucleosides and Nucleotides. 2004; 69T.
54. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 413-492.
55. Regesta G, Tanganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Res.* 1999; 34(2-3): 109-22.
56. Ribeiro JA, Sebastião AM, Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology.* 2003; 68:377-392.
57. Rosim, FE. Estudo do bloqueio do receptor adenosinérgico A2A no modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009.
58. Silva AV, Cavalheiro EA. Epilepsia: uma janela para o cérebro. *Revista Multi Ciência.* 2004.
59. Silva IR, Nehlig A, Rosim FE, Vignoli T, Persike DS, Blini JP, Cavalheiro EA, et al. Epilepsia e neuroproteção: o papel do agonista adenosinérgico A1 (R-Pia) na modulação da crise induzida por pilocarpina. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 2008; 14(3):106-110.
60. Stone T.W., Behan W.M.H.: Adenosine receptors, kynurenines and neuroprotection. *Drug Dev. Res.*, 2000, 50, 15, S07-03.
61. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983; 9(3):315-35.
62. Vianna EP, Ferreira AT, Dona F, Cavalheiro EA, Fernandes MJS. Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats. *Epilepsia.* 2005; 5: 166-73.
63. Vorhoff T, Zimmermann H, Pelletier J, Sévigny J, Braun N. Cloning and characterization of the ectonucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signaling.* 2005; 1: 259-270.
64. Wardas J. Adenosine and Neuroprotection. *Pol J Pharmacol.* 2002; 54: 313-326.
65. Zeraati M, Mirnajafi-Zadeh J, Fatholhahi Y, Namvar S, Rezvani ME. Adenosine A1 and A2A receptors of hippocampal CA1 region have opposite effects on piriform cortex kindled seizures in rats. *Seizure.* 2006; 15: 41-48.
66. Zhang G, Franklin PH, Murray TF. Activation of adenosine A1-receptors underlies anticonvulsant effect of CGS21680. *Eur J Pharmacol.* 1994; 255: 239-43.
67. Zimmermann H. 50-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 1992; 285: 345-365.
68. Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res.* 2001; 52: 44-56.
69. Zuchora B, Wielosz M, Urbanska EM. Adenosine A1 receptors and the anticonvulsant potential of drugs effective in the model of 3-nitropropionic acid-induced seizures in mice. *European Neuropsychopharmacology.* 2005; 15: 85-93.

INTERACCIONES FÁRMACO-DIANA COMO BASE PARA EL DISEÑO DE NUEVOS FÁRMACOS

Escubedo E, Camarasa J, Pubill D.

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

Recientemente han aparecido empresas de servicios que ofrecen la externalización del análisis informático de datos biológicos tanto a empresas farmacéuticas como a centros de investigación que no cuentan con los expertos necesarios para cubrir todas sus necesidades en biología computacional. Dentro de los campos que puede cubrir el área de Investigación y Desarrollo de una empresa de servicios informáticos, destaca **el diseño racional de fármacos**.

El diseño de fármacos, también denominado a veces diseño “racional” de fármacos, es el proceso científico que tiene lugar para encontrar nuevos medicamentos basados en el conocimiento de la diana biológica. El objetivo o destino de un fármaco típicamente es una molécula clave; o una vía metabólica particular, la cual es específica de una enfermedad o patología; o apunta a la contagiosidad o a la supervivencia de un microbio patógeno. Algunas estrategias procuran detener el funcionamiento de una ruta metabólica alterada haciendo que una molécula clave deje de funcionar. Los fármacos pueden ser diseñados para unirse a la región activa de una molécula específica e inhibirla. Pero, además, estos fármacos también tienen que ser diseñados de tal manera que no afecten ninguna otra molécula importante que pueda tener una apariencia similar a la molécula clave (especificidad).

A diferencia de los métodos tradicionales de descubrimiento de fármacos que se basan en las pruebas de ensayo y error de las sustancias químicas en las células cultivadas o los animales, el diseño “racional” de medicamentos parte de la hipótesis que la modulación de una diana biológica específica puede tener valor terapéutico.

Para que una proteína sea seleccionada como diana farmacológica se requieren dos piezas esenciales: la evidencia de que la modulación de la misma tiene valor terapéutico y que dicha diana es "*drugable*". Esto significa que es capaz de unirse a una molécula pequeña y que su actividad puede ser modulada por la molécula pequeña.

En el sentido más estricto pues, la frase "diseño de fármacos" es hasta cierto punto equivocada. Lo que realmente se entiende por diseño de fármacos es diseño de ligandos. Éste se basa en técnicas de modelado para la predicción de la afinidad de la unión del ligando a la diana. Así lo que se diseña son pequeñas moléculas complementarias en forma y carga a la diana farmacológica con la que interactúan, por lo que se unirán a ella con elevada afinidad. Sin embargo, hay muchas otras propiedades tales como la biodisponibilidad, la vida media metabólica, los efectos secundarios, etc., que primero deben optimizarse antes de que un ligando puede convertirse en un fármaco seguro y eficaz. Estas otras características son difíciles de optimizar utilizando las citadas técnicas.

Son ejemplos de diseño "racional" de fármacos el imatinib, un inhibidor de la tirosin-kinasa diseñado específicamente para la proteína de fusión bcr-abl característica de las leucemias cromosoma Filadelfia positivas (leucemia mieloide crónica y ocasionalmente la leucemia linfocítica aguda). El Imatinib difiere fundamentalmente de otros medicamentos anticancerosos anteriores en que la mayor parte de esos agentes quimioterapéuticos simplemente apunta hacia las células de rápida multiplicación, y no diferencian entre células cancerosas y células sanas de otros tejidos. Por el contrario, el imatinib presenta una notable selectividad en sus efectos. Otros fármacos diseñados bajo un conocimiento específico de la diana farmacológica han sido: Cimetidina, el prototipo de agonista del receptor H2 a partir del cual se desarrollaron los miembros posteriores de esta clase, los inhibidores selectivos de la COX-2 (AINE), los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, el Zanamivir (antiviral) y la Enfuvirtide (inhibidor de la entrada del VIH)

DISEÑO (RACIONAL) DE FÁRMACOS

En la última década, el número de moléculas candidatas como nuevos fármacos ha descendido con respecto a décadas anteriores. Para paliar este problema, la

estrategia de las empresas farmacéuticas pasa necesariamente por aumentar la capacidad de descubrimiento de compuestos. Esto se puede realizar “*in vitro*” mediante técnicas de búsqueda de alto rendimiento (*High-Throughput Screening*, HTS) o bien “*in silico*” utilizando técnicas computacionales de simulación de interacciones entre posibles fármacos y la proteína diana.

1. HTS *in vitro*

El cribado de alto rendimiento es un método de investigación sistemática indiscriminada de moléculas para la búsqueda y descubrimiento de nuevos fármacos. La combinación de la robótica actual, los avances en el procesamiento de datos y la sensibilidad de los detectores, así como la mejora de los aparatos automáticos ha permitido a los investigadores usar el cribado de alto rendimiento como una herramienta rutinaria para hacer millones de *tests* bioquímicos, genéticos o farmacológicos en un breve periodo de tiempo. La utilización de este proceso permite identificar rápidamente compuestos activos, anticuerpos o genes que modulan una vía bioquímica de interés. Los resultados de estos experimentos proporcionan un punto de partida para el diseño de fármacos y para la comprensión del papel que desarrollan ciertos procesos bioquímicos.

Una pieza clave y presente en todo ensayo de cribado de alto rendimiento es la placa donde se realizan los experimentos. Esta placa es un pequeño contenedor, normalmente de plástico, dividida en varios pozos en los que se adicionan en el orden correspondiente los diferentes reactivos utilizados en el ensayo. Para preparar cualquier ensayo de cribado de alta eficacia se llenan los pocillos de la placa con la entidad biológica que se desea estudiar, ya sean proteínas, células, embriones, etc. A continuación se adicionan los reactivos y se deja reaccionar durante el tiempo necesario y, pasado este intervalo, se hacen las medidas correspondientes a través de cada uno de los pocillos de la placa, ya sea de forma manual (cuando la medida se basa en la observación microscópica) o automatizada. En este último caso la toma de datos se puede automatizar y existen máquinas especializadas que miden fluorescencia, absorbancia u otros parámetros fisicoquímicos relevantes para el ensayo. Una máquina con una elevada capacidad de análisis puede medir decenas de placas en pocos minutos, generando rápidamente miles de datos experimentales. Los resultados obtenidos permiten

hacer una primera selección de los compuestos que presentan el efecto deseado (llamados *hits*) y separarlos de aquellos que no presentan estas propiedades. A continuación, con esta colección de compuestos seleccionados se realizan experimentos adicionales para confirmar y refinar las observaciones. Así este procedimiento sirve para identificar nuevos "cabezas de serie", o moléculas prototipo pertenecientes a una clase estructural determinada y con potencial en una área terapéutica concreta. Modificaciones químicas subsiguientes (optimización) tienden a producir "análogos" de esas estructuras con una mayor actividad o una menor incidencia de efectos colaterales (*leads*). Este método de descubrimiento de nuevos agentes con actividad biológica es interesante desde el punto de vista de que puede convertir a nuevas clases estructurales de compuestos en fármacos potenciales pero, al estar basado fundamentalmente en técnicas de ensayo y error, consume mucho tiempo y requiere grandes recursos económicos. El porcentaje de éxitos se ha estimado inferior a 1 por cada 10.000 compuestos sintetizados [16].

2. *In silico*

Todo un arsenal de nuevas metodologías, con un importante componente matemático y computacional, hacen uso de la información sobre la estructura de macromoléculas diana para crear modelos tridimensionales de receptores y ligandos, estudiar sus preferencias conformacionales, dilucidar la naturaleza y magnitud de las fuerzas interatómicas que gobiernan su interacción, y analizar el comportamiento dinámico de cada molécula por separado y de sus respectivos complejos. Estos procedimientos ayudan a comprender mejor el comportamiento de estos sistemas a nivel submolecular, permiten establecer comparaciones entre teoría y datos experimentales, e incluso permiten realizar predicciones cuantitativas, por lo que constituyen herramientas muy poderosas para diseñar nuevas moléculas con afinidad por un determinado receptor [18].

La principal área de conocimiento que se dedica a este estudio es la química computacional cuyo objetivo se ha extendido al diseño de compuestos que presenten no sólo una elevada afinidad por su receptor, sino también una optimización de sus propiedades farmacocinéticas, que aseguran un balance en la absorción, distribución y metabolismo del fármaco, junto a su excreción y toxicidad.

Sabemos que la acción farmacológica de un compuesto se basa en la interacción y el reconocimiento entre este ligando y su receptor. La afinidad entre ligando y receptor refleja el balance existente entre básicamente cuatro factores. En primer lugar, la afinidad depende del conjunto de interacciones establecidas entre los grupos químicos presentes en el ligando con los residuos del receptor. Dichas interacciones comprenden una gama de contribuciones diversa tanto en su contribución energética como en su direccionalidad, incluyendo entre otras puentes salinos, puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo o de van der Waals. En segundo lugar, la afinidad está afectada por la desolvatación de ligando y receptor en el proceso de formación del complejo. En tercer lugar, la interacción puede conllevar cambios estructurales tanto en el ligando como en el receptor. Finalmente, otro factor a considerar es el cambio entrópico asociado a la formación del complejo, así como a la pérdida de flexibilidad conformacional intramolecular. Estos últimos tres factores tienen un impacto negativo sobre la afinidad, que debe ser compensado con la contribución positiva debida a la energía de interacción entre ligando y receptor. El éxito del diseño de fármacos reside en la optimización del balance entre dichos factores. Ello conlleva la concepción de una estructura química con una distribución espacial de grupos funcionales que maximice la complementariedad entre ligando y receptor. Así, pues, cabe establecer una relación subyacente entre la actividad biológica de un compuesto dado con el grado de complementariedad existente entre su estructura química y el receptor. Es lo que denominamos comúnmente reconocimiento-afinidad [14].

2.1 Cribado virtual

El desarrollo y lanzamiento de un nuevo fármaco al mercado requiere a la industria farmacéutica una media de 12 a 20 años y unos costes de aproximadamente 850 millones de euros. Las técnicas de cribado virtual resultan baratas (ahorran en compra de reactivos y robotización), rápidas, y permiten tener en cuenta un gran número de compuestos *in silico* del orden de billones, cifra impensable experimentalmente. Típicamente, en una cascada de cribado, una quimioteca virtual que contiene unas 10^6 - 10^{12} estructuras es sucesivamente filtrada y reducida a una colección de unos 100-1000 candidatos. Por ello, se puede considerar un buen complemento para las técnicas de HTS como fuente de obtención de nuevos leads.

Ahora bien, si no se aplican restricciones, el cribado virtual puede sugerir potenciales hits no accesibles sintéticamente. Sin embargo, proporciona información acerca del modo de interacción fármaco-diana y es un buen criterio para la priorización de moléculas a sintetizar [7].

Existen dos aproximaciones al cribado de compuestos. Cuando se dispone de la estructura tridimensional de la diana terapéutica, bien obtenida por métodos experimentales (cristalografía de rayos X o RMN) o bien a través de la construcción de modelos moleculares, se sigue la metodología de **diseño de ligandos basado en su estructura de la diana o *structure-based***. Se incluyen aquí las técnicas de *docking* o acoplamiento (intento de encontrar el “mejor” acoplamiento entre dos moléculas: un receptor y un ligando). En caso contrario o en caso de que se prescinda, el cribado virtual de ligandos se puede realizar mediante búsquedas ***ligand-based***, basadas en el análisis y comparación de propiedades moleculares y datos de afinidad por el receptor para ligandos conocidos, sin tener en cuenta la estructura de dicho receptor [15,17]. Se incluyen aquí las técnicas de búsqueda de similitud mediante descriptores 2D/3D, QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship* o relación cuantitativa de los cambios estructurales de un conjunto de compuestos con los cambios en actividad), desarrollo de modelos farmacofóricos (identificación del conjunto de características estructurales de un ligando directamente relacionadas con los sitios claves de interacción de un receptor), y técnicas de *shape matching* (superposición de la forma de dos ligandos). Por lo tanto, las herramientas de cribado virtual requieren inevitablemente conocer o bien la actividad de algunos compuestos o la estructura de la diana biológica.

Una cascada típica de cribado virtual contiene diferentes pasos de filtrado que conllevan a una reducción del número de compuestos candidatos a ser examinados experimentalmente, como mínimo en nueve órdenes de magnitud, acabando con unos 1000 compuestos para su ensayo clínico. Dichos filtros se aplican de forma secuencial de acuerdo con el nivel de requerimientos computacionales que utiliza cada una de las técnicas (de menor a mayor coste de cálculo) y la complejidad de la información necesaria para cada una de ellas. Para la identificación de hits es necesario partir del análisis conformacional de las estructuras de la quimioteca generada. A partir de ellas se realiza un cribado basado en la estructura o en el

ligando. A partir de ahí se seleccionan las moléculas que poseen estructura y propiedades de fármaco (*drug likeness*), así como propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad) de interés con el fin de optimizar simultáneamente la potencia y la farmacocinética. La búsqueda se puede refinar, aplicando filtros de similitud 2D/3D y también mediante modelos farmacofóricos para seleccionar compuestos focalizados hacia un tipo de estructura concreta necesaria para la interacción con la diana de estudio. Una vez se ha focalizado suficiente la quimioteca se procede con la fase de descubrimiento y optimización de leads [19].

2.1.1. Diseño basado en ligando

Los primeros intentos dirigidos a incrementar la probabilidad de sintetizar un análogo activo o de encontrar un nuevo cabeza de serie se basaron en encontrar correlaciones entre la estructura química de una serie de compuestos y su actividad biológica. De ahí surgieron las famosas siglas QSAR, acrónimo de *Quantitative Structure-Activity Relationships*. Se utiliza el concepto de farmacóforo para designar el conjunto de requisitos geométricos y químicos esenciales que debe presentar un compuesto para poder interactuar de forma efectiva con su diana macromolecular. Es un hecho bien conocido que ante un receptor de estructura desconocida (el problema más frecuente hasta hace pocos años), la variación sistemática de la estructura química de sus ligandos lleva rápidamente a la conclusión de que algunas partes de la molécula son críticas para la actividad, mientras que otras pueden modificarse y su alteración sólo conlleva pequeñas variaciones de afinidad. Estas diferencias, que se manifiestan con facilidad en los resultados de los ensayos de fijación de ligandos marcados (*binding*) o de otras pruebas farmacológicas, llevaron a postular el concepto de farmacóforo, entendido como el conjunto de grupos químicos que todas las moléculas activas tienen en común y que son esenciales para el reconocimiento por parte del receptor. Esta formulación es semejante a la analogía entre llave y cerradura que sirvió inicialmente para comprender la complementariedad entre los sitios activos de las enzimas y sus sustratos.

Centrado el concepto de farmacóforo podemos ya abordar los métodos QSAR. La premisa fundamental de los métodos QSAR es que una propiedad macroscópica

como la afinidad entre ligando y receptor está asociada en último término a la naturaleza, distribución espacial y características químicas presentes en la estructura molecular del ligando, que deben maximizar la complementariedad con los residuos que definen el centro de unión del receptor. Por ello, el objetivo principal consiste en establecer una hipótesis de farmacóforo en base a la comparación entre las diferencias de actividad biológica para una serie de compuestos que actúan sobre la misma diana y las diferencias estructurales entre dichos ligandos [5].

Así, las relaciones QSAR persiguen identificar la relación existente entre la actividad biológica y las características químicas específicas presentes en la estructura de ligandos que interaccionan en el mismo centro de unión del receptor. Tradicionalmente, los métodos QSAR utilizan una combinación de descriptores que reflejan las propiedades electrostáticas, estéricas e hidrofóbicas de los grupos químicos presentes en el ligando. De esta forma, dos compuestos cuya estructura química sea altamente similar, y por tanto su forma y volumen, así como su polaridad y lipofilia, deben dar lugar a respuestas biológicas parecidas.

Los métodos QSAR pueden dividirse en dos grandes categorías [16]: métodos topológicos/estadísticos y métodos de modelado molecular. En la aproximación topológica sólo se tiene en cuenta la estructura química "plana" de la molécula y se utilizan técnicas estadísticas o de reconocimiento de patrones para encontrar las QSAR. En los métodos de modelado se consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones y son importantes, entre otros, el análisis conformacional, la mecánica cuántica, los campos de fuerzas, la termodinámica estadística, y los gráficos moleculares interactivos. Estos últimos permiten la representación y manipulación de las moléculas en tres dimensiones, lo que proporciona una información espacial que es esencial para comparar moléculas y para estudiar la interacción entre ligandos y receptores macromoleculares [8]. Es lo que se conoce como técnicas 3D-QSAR, que utilizan como propiedades las medidas directas de campos moleculares en regiones concretas del espacio tridimensional que rodea al ligando con objeto de explicar la actividad biológica. Además, mientras que las técnicas QSAR están limitadas a series estructuralmente similares de ligandos, las

técnicas 3D-QSAR permiten la comparación de compuestos con estructuras químicas diversas [5].

2.1.2. Diseño basado en la diana proteica

Cuando la estructura de la diana es conocida, usualmente a partir de estudios de cristalografía de rayos X, por resonancia magnética nuclear (RMN) o bien por técnicas bioinformáticas como predicción de estructura basada en homología de secuencia, la información acerca de la estructura atómica del centro de unión permite plantear nuevas aproximaciones al diseño de fármacos. Así, en primer lugar cabe plantearse la posibilidad de identificar compuestos (*hits*) que aunque tengan una actividad moderada (por ejemplo, una concentración para inhibición del 50% del orden 10^{-5} M), aporten una estructura química novedosa no explorada. Por otra parte, el conocimiento estructural del receptor abre la posibilidad de examinar la introducción de cambios estructurales en el ligando con objeto de optimizar su afinidad, hasta alcanzar valores en el rango nM (*leads*).

Para obtener un buen sistema de diseño racional de fármacos mediante técnicas de simulación computacional basadas en la diana es necesario disponer de una serie de sub-sistemas bien definidos:

- A) Un procedimiento de generación de variabilidad (química combinatoria *in silico*) que permita partir de un conjunto inicial de miles o millones de compuestos iniciales.
- B) Un modelo computacional estructural de muy alta calidad del centro activo de las proteínas diana, para poder simular las interacciones con los fármacos de una forma fiable, con garantías de éxito.
- C) Un método de análisis y filtrado de las interacciones entre las moléculas iniciales y la proteína diana (métodos conocidos como de acoplamiento o encaje o “*docking*”).
- D) Una técnica que permita el refinamiento final de aquellas moléculas seleccionadas mediante el análisis fino de las interacciones a nivel atómico (dinámica molecular).

a. Generación de variabilidad

Como punto de partida se necesita una base de datos de grupos funcionales químicos que puede obtenerse, bien de repositorios privados de empresas farmacéuticas, bien de bases de datos públicas. Un buen ejemplo de esto último es

ChEBI (*Chemical Entities of Biological Interest*; [http:// www.ebi.ac.uk/chebi](http://www.ebi.ac.uk/chebi)), con casi 550.000 compuestos accesibles. A continuación es necesario convertir cada uno de estos compuestos a un formato tridimensional en el que para cada estructura se calculen una serie de conformeros (variantes estructurales en 3D) dependiendo de la libertad de giro de cada enlace de la molécula. En este momento, a cada molécula se le asignan parámetros de propiedades fisicoquímicas que permitirán su uso en los pasos de filtrado posteriores. De cada una de estas moléculas se generarán variantes mediante un sistema de combinatoria química virtual. En esquema, se parte de una librería de sustituyentes de varios cientos de pequeñas moléculas (tales como CH₃, COOH, etc.) que pueden ser utilizados en diferentes repeticiones y combinaciones. La librería está ordenada en función de las características fisicoquímicas de los grupos funcionales representados (aminas, aldehídos, isocianatos, tioles, etc.) y permite la sustitución sistemática de cualquier grupo funcional de la molécula original por uno o una combinación de los presentes en la base de datos. De esta forma, y como resultado final de este paso, se obtiene una librería de millones de compuestos que se utilizará como punto de partida para la búsqueda de fármacos.

b. Modelado de centros activos.

Un punto crucial para poder diseñar fármacos en el ordenador es tener una imagen precisa de las características fisicoquímicas del centro activo de la proteína diana. Esto incluye la posición espacial de los diferentes átomos que lo constituyen así como un cálculo de las propiedades de la superficie: electrostáticas, de accesibilidad al solvente, hidrofobicidad, etc.

La situación ideal pasa por obtener una estructura experimental de la proteína (mejor aún si ésta se obtiene en presencia de un ligando o inhibidor) mediante técnicas de Cristalografía de Rayos X o de Resonancia Magnética Nuclear. Las estructuras conocidas que han sido resueltas se pueden obtener de la base de datos pública "*Protein Data Bank*" (PDB; <http://www.pdb.org>) que cuenta en la actualidad con 64.500 entradas. Sin embargo, el tamaño del *Protein Data Bank* es apenas una ínfima fracción de todas las proteínas conocidas; por ejemplo, la base de datos *Uniprot* (Universal protein resource; <http://www.uniprot.org>), cuenta en la actualidad con más de 11.160.000 secuencias de proteína. Por esta razón, en ausencia de una estructura real, se suelen utilizar métodos de aproximación teórica

a la conformación del centro activo. Estos métodos se denominan de **Modelado por Homología**, el cual puede llevarse a cabo si la proteína problema cuenta con un homólogo ya incluido en PDB (es decir, otra proteína con un mismo origen evolutivo y por tanto con la misma o similar disposición espacial). Si no existe tal homólogo de estructura conocida es necesario realizar aproximaciones más arriesgadas basadas en compatibilidad secuencia-estructura o mediante técnicas de “reconocimiento de plegamiento” (o “*threading*”). En la actualidad existe toda una variedad de métodos de predicción que utilizan bien Modelado por Homología (MODELLER, SWISS-MODEL) [2, 4, 15] o técnicas híbridas de Modelado por Homología y “*threading*” (PHYRE, SAM-T08, FUGUE, etc.) [1], disponibles en diferentes servidores públicos y con unos niveles razonablemente elevados de fiabilidad.

Mediante técnicas que combinan estos métodos y otros de Dinámica Molecular (ver más adelante) se pueden llegar a modelar interacciones proteína-proteína y localizar inhibidores y sustratos en centros activos de proteínas diana de estructura desconocida [10].

c. Análisis de interacciones

Es evidente que para que la unión entre un ligando y su centro activo sea energéticamente rentable el complejo formado por ambos ha de ser más estable que cada una de las partes por separado; este es el llamado principio de mínima energía. En otras palabras, una asociación será rentable si los socios ganan más actuando de forma conjunta que lo que ganan por separado. El saber cómo ocurre esta unión, así como la caracterización y cuantificación de los distintos eventos que tienen lugar en tal proceso, es un área de investigación en creciente desarrollo y tiene lugar primordialmente mediante los denominados métodos de *Docking*.

Un protocolo de acoplamiento/encaje molecular o “*docking*” se caracteriza tradicionalmente por dos aspectos: el encaje en sí mismo, es decir, el método seguido para muestrear el espacio conformacional del complejo ligando-proteína diana, y la función de puntuación (*score*) utilizada para evaluar la afinidad de la interacción entre ambos. Aunque existen diferentes implementaciones de algoritmos para encontrar configuraciones proteína-ligando de calidad óptima, actualmente todos los algoritmos modernos de encaje modelan el ligando como flexible, dejando de lado las aproximaciones más primitivas en las que el ligando se consideraba rígido.

Así, por ejemplo, el programa de *Docking* de libre disposición AutoDock 4.2 usa tres tipos distintos de algoritmos: La simulación de calentamiento-enfriamiento de Montecarlo, el tradicional algoritmo genético y un híbrido del mismo (Lamarckian genetic algorithm) cuyo fundamento puede consultarse en http://es.wikipedia.org/wiki/Simulated_annealing y http://es.wikipedia.org/wiki/Algoritmo_gen%C3%A9tico. En cuanto a la función de *scoring* de AutoDock 4.2 se basa en un análisis de regresión lineal, el campo de fuerzas AMBER y la información disponible de toda una serie de complejos proteína-ligando con constantes de afinidad conocidas [12].

d. Refinamiento mediante dinámica molecular

La Dinámica Molecular (MD; *Molecular Dynamics*) es una técnica de simulación computacional en la que las interacciones entre átomos y moléculas se analizan durante periodos discretos de tiempo, permitiendo su movimiento de acuerdo a las fuerzas físicas que gobiernan dichas interacciones. En el caso de que se desee una imagen mucho más fina, se utiliza una variante conocida como Interfaz Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QM/MM; Quantum Mechanics/Molecular Mechanics), mucho más costosa computacionalmente pero que proporciona un tratamiento más realista de los enlaces entre átomos, permitiendo la rotura y formación de compuestos químicos, imitando así el proceso enzimático que tiene lugar en el centro activo de la proteína de interés. El uso de las técnicas de MD y QM/ MM arroja como resultado una visualización del movimiento de los sustratos naturales y los fármacos permitiendo el rediseño de los mismos a modo de retroalimentación del sistema de diseño y filtrado de compuestos. Asimismo, la técnica de QM/MM permite la obtención de modelos de las estructuras intermedias que se forman durante los procesos enzimáticos. Éstas, generalmente poseedoras de una cierta estabilidad energética, suelen ser un punto de partida excelente para el diseño de fármacos, ya que encajan de forma particularmente adecuada en el centro activo.

Como resultado global del proceso de diseño de fármacos mediante filtrado virtual, se obtiene idealmente una colección de unas decenas o centenas de compuestos (a partir de los millones de moléculas iniciales) ordenados en función de su potencial actividad y para cada uno de los cuales se ofrece un posible modelo dinámico de interacción. Una vez se prueba en el laboratorio la actividad real de los mismos en el

tubo de ensayo, los resultados experimentales son a su vez fuente de información que se utiliza para el rediseño del protocolo virtual, permitiendo su refinamiento continuo [6].

2.2. Predicción de propiedades ADMET

Antes de seguir en el proceso de desarrollo de un nuevo fármaco es necesario evaluar a priori las propiedades farmacocinéticas, con el fin de excluir aquellos compuestos que puedan tener problema de biodisponibilidad, una metabolización inadecuada o bien dar lugar a problemas de toxicidad. En este sentido, la posibilidad de disponer de filtros adecuados que permitan focalizar el esfuerzo exclusivamente en compuestos con buenas cualidades de fármaco es de vital importancia a fin de reducir el enorme coste asociado al desarrollo de un nuevo medicamento. Gran parte de esta preocupación cabe atribuirle a los estudios de Lipinski [9], quien sugirió un conjunto de reglas empíricas que debía reunir un compuesto para ser considerado como “*drug-like*”, tales como una masa molecular inferior a 500, un coeficiente de partición-agua inferior a 5, un número de grupos dadores inferior a 5, y un número de grupos aceptores de puente de hidrógeno inferior a 10. El impacto de estos estudios ha sido tan grande que ha motivado su extensión a otras propiedades, como la capacidad de fármacos que deben actuar en el sistema nervioso central para atravesar la barrera sangre-cerebro. La identificación de las posibles biotransformaciones metabólicas que puede sufrir un fármaco es relevante de cara comprender su eficacia farmacológica. Por ello, se está dedicando un notable esfuerzo en la predicción de los procesos metabólicos que puede sufrir un candidato a fármaco en la fase de descubrimiento, y en base a dicha información decidir si dicho compuesto debe ser eliminado o bien si es necesario modificar su estructura para incrementar su estabilidad química. Un ejemplo de dicho esfuerzo es el programa *Metasite* [3], que permite explorar en base a la estructura del ligando posibles modificaciones metabólicas asociadas a su interacción con citocromos.

La predicción de la toxicidad de un compuesto es particularmente delicada, pues los efectos tóxicos dependen en gran medida de diversos factores, como el órgano donde se encuentra la diana terapéutica y del tiempo considerado [11]. No obstante, entre las áreas exploradas cabe mencionar la posible aparición de efectos tóxicos debido a la falta de selectividad del ligando, por cuanto ello permite su interacción

con dianas diferentes de aquella para la cual fue diseñado. Ello es especialmente relevante en dianas que pertenecen a familias de proteínas relativamente grandes, tales como quinasas, proteasas o receptores nucleares. En estos casos, es posible plantear un *screening* inverso con objeto de determinar la capacidad de un ligando de interactuar con diversos posibles receptores [13].

REFERENCIAS

1. Bennett-Lovsey RM, Herbert AD, Sternberg MJ and Kelley LA. Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 70: 611-625, 2008.
2. Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J and Schwede T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat.Protoc.* 4: 1-13, 2009.
3. Cruciani G, Carosati E, De Boeck B, Ethirajulu K, Mackie C, Howe T and Vianello R. MetaSite: understanding metabolism in human cytochromes from the perspective of the chemist. *J.Med.Chem.* 48: 6970-6979, 2005.
4. Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY and Sali A. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol.Biol.* 426: 145-159, 2008.
5. Gago F. Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. En: *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía I. Diseño de medicamentos.* 253-312
6. Gómez-Puertas P. Informática aplicada a ciencias de la vida: cooperación entre investigación básica y utilidad práctica. *Lifescienceslab*, Mar-abr: 32-36, 2010
7. Langer T, Wolber G. Virtual combinatorial chemistry and in silico screening: Efficient tools for lead structure discovery? *Pure Appl. Chem.* 76: 991-996, 2004.
8. Langridge R, Ferrin TE, Kuntz ID and Connolly ML. Real-time color graphics in studies of molecular interactions. *Science* 211: 661-666, 1981.
9. Lipinsky CA. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* 1: 337-341, 2004.
10. Mendieta J, Rico AI, Lopez-Vinas E, Vicente M, Mingorance J and Gomez-Puertas P. Structural and functional model for ionic [K(+)/Na(+)] and pH dependence of GTPase activity and polymerization of FtsZ, the prokaryotic ortholog of tubulin. *J.Mol.Biol.* 390: 17-25, 2009.
11. Merlot C. In silico methods for early toxicity assessment. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* 11: 80-85, 2008.
12. Muegge I; Rarey M. Small Molecule Docking and Scoring. En *Reviews in Computational Chemistry*; Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B., Ed.; Wiley and Sons: New York, 17: 1-60, 2001.
13. Naumann T and Matter H. Structural classification of protein kinases using 3D molecular interaction field analysis of their ligand binding sites: target family landscapes. *J.Med.Chem.* 45: 2366-2378, 2002.
14. Pouplana R, Barril X, Luque FJ. Química computacional en diseño de fármacos. *Lifescienceslab: informática y lins.* Mar-abr: 28-31, 2010.
15. Saxena AK, Alam I, Dixit A and Saxena M. Internet resources in GPCR modelling. *SAR QSAR Environ.Res.* 19: 11-25, 2008.
16. Sheridan RP and Venkataraghavan R. Designing novel nicotinic agonists by searching a database of molecular shapes. *J.Comput.Aided Mol.Des.* 1: 243-256, 1987.
17. Shoichet BK. Virtual screening of chemical libraries. *Nature* 432: 862-865, 2004.
18. Terfloth L. *Drug Design.* En *Chemoinformatics*; Gasteiger, J.; Engels, T., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, pp 597-618, 2003.
19. Pérez-Nueno VI. Tesis doctoral: Herramientas de cribado virtual aplicadas a inhibidores de entrada del VIH. Diseño de nuevos compuestos anti-VIH. IQS-Universidad Ramón Llull, 2009.

BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA DE MEDICAMENTOS

Fagiolino P, Vázquez M, Ibarra M.

Departamento de Farmacología y Biofarmacéutica, Facultad de Química, Universidad de la República de Uruguay, Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCIÓN

La sociedad necesita medicamentos eficaces y seguros, los cuales requieren ser investigados con aceptable rigurosidad. La inversión y el riesgo que esta tarea requiere, han llevado a otorgarle a la empresa creadora del medicamento un período de comercialización protegida (patente de invención). Pasado ese lapso, y comprobadas las virtudes terapéuticas del producto, se generan nuevos intereses: 1) de empresas farmacéuticas para comercializar similares al original; y 2) de la propia sociedad para reducir los costos de tratamientos con el mismo ingrediente activo. Para que la libre competencia satisfaga el interés social, de abaratamiento de costos y mayor accesibilidad para la población, se ha establecido subrogar la investigación clínica a la pre-comercialización por un único ensayo llamado de Bioequivalencia.

El estudio de bioequivalencia tiene por objetivo demostrar que el medicamento competidor (*Test*) posee un aceptable grado de similitud con el medicamento original (Referencia). Si bien antiguamente se requería que el producto *Test* fuera idéntico, en ingrediente activo, en forma farmacéutica, y en dosis nominal, al producto Referencia (equivalente farmacéutico), la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su informe N°40, de junio 2006 [1], acepta que productos conteniendo la misma parte activa, aunque presentada en diferente ingrediente y hasta en diferente forma farmacéutica (alternativa farmacéutica), puedan aspirar a ser competidores similares al original.

Importa precisar adecuadamente el alcance que tiene la frase “grado aceptable de similitud”, a los efectos de evitar expectativas desmedidas con el medicamento similar que demostró ser bioequivalente al producto Referencia. Lo que primero asoma como significado, es precisamente el concepto que dio nacimiento al ensayo clínico de bioequivalencia: equivalencia terapéutica. Es decir, que el aceptable grado de similitud refiere a que el *Test* comparte el mismo perfil de seguridad y eficacia que la Referencia. Sin embargo, veremos más adelante, que sería imposible asegurarlo.

EQUIVALENTES TERAPÉUTICOS

Es inapropiado determinar la actividad farmacológica similar entre *Test* y Referencia, en virtud de lo insuficientemente preciso y exacto que resulta medir los efectos producidos por la parte activa de ambos preparados. Incluso midiendo alguno de los conocidos efectos que posee el fármaco y registrando similares intensidades de los mismos entre *Test* y Referencia, sería incorrecto aseverar que en pacientes se logrará evitar los riesgos de toxicidad y tratar eficazmente la enfermedad en similares magnitudes, cuando sean llevados a cabo idénticos tratamientos con ambos productos. La compleja transducción de las acciones farmacológicas, en efectos primeramente, y en respuestas clínicas finalmente, lleva a que la subrogación por ensayos farmacodinámicos no sea la más evidente demostración de equivalencia terapéutica.

Lo que realmente se evalúa en los ensayos de bioequivalencia es la similitud farmacocinética de ambos productos. Es decir, el aceptable apartamiento de concentraciones sanguíneas o de exposiciones sistémicas al fármaco tras la administración de *Test* y de Referencia. La condición para que el Similar sea considerado bioequivalente al Original es que logre demostrar, con una confianza del 90%, que el cociente T/R (*Test* / Referencia) de medias poblacionales en algunas salientes características de exposición (concentración máxima [C_{max}], área bajo la curva concentración-tiempo [AUC]) se ubique entre 0,8 y 1,25. El *Test* debe asimismo registrar similar tiempo de máxima concentración [T_{max}] que la Referencia.

Transportando esta definición al escenario clínico puede fácilmente demostrarse que si el paciente ubicara sus concentraciones en las cercanías de los bordes de su franja terapéutica mientras recibe Referencia, al cambiar por un *Test* que difiriera en hasta 20%, experimentará necesariamente ineficacia o toxicidad (Figura 1). Si agregamos que la definición establece apartamientos máximos de las respectivas medias poblacionales, la variabilidad interindividual del cociente T/R augura más casos de falla terapéutica al intercambiar *Test* por Referencia en algunos pacientes. En resumen, la satisfacción de bioequivalencia no asegura la equivalencia terapéutica en todos los individuos. La terapéutica es un concepto eminentemente individual, no siendo admisible consignar la equivalencia terapéutica en base a un resultado medio que no representa a un individuo sino al promedio de individuos, que esencialmente no existe como sujeto de tratamiento farmacológico.

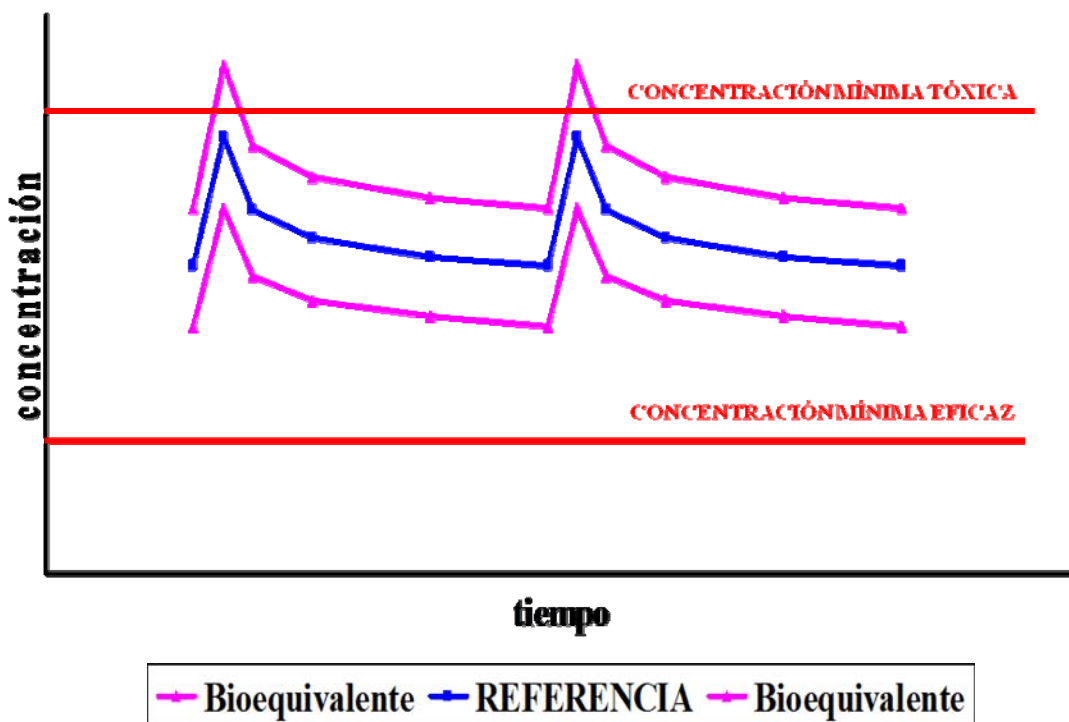


Figura 1. Administración crónica de un medicamento Referencia y perfiles bioequivalentes de medicamentos Similares. Notar como en este paciente pueden registrarse niveles tóxicos de fármaco cuando es tratado con un Similar, siguiendo el mismo plan posológico que venía recibiendo con la Referencia. En el caso de ubicar niveles cerca de la concentración mínima eficaz, el otro medicamento bioequivalente hubiese conducido a un tratamiento subterapéutico.

Lamentablemente se ha insistido demasiado sobre este alcance de la bioequivalencia, haciendo pesar el resultado del ensayo en una cualidad que no

pertenece a los productos sino que reposa en los requerimientos terapéuticos del paciente. De aquí surge la dramática insatisfacción que pudiera significar la asimilación de esta realidad. En este contexto, sería además injusto decir que un producto *Test*, bioinequivalente a la Referencia, fuese mejor o peor que ella. Simplemente no serían intercambiables en tratamientos con idénticas posologías. Peor aún, siendo bioequivalentes podrían no ser intercambiables en algunos pacientes.

De manera constante se ha transitado entre dos aguas a lo largo de los años con el concepto de la bioequivalencia. Si bien se insistió en mantener como meta la equivalencia terapéutica entre *Test* y Referencia, se asumió que necesariamente debían también ambos productos ser similares en biodisponibilidad para lograr dicho objetivo. Sobre este eje de razonamiento analizaremos a continuación la más apropiada razón de estudiar la bioequivalencia como método para aprobar la comercialización de un medicamento similar a la Referencia.

El concepto de biodisponibilidad comprende tanto la cantidad de ingrediente activo (*per se* o como precursor del verdadero fármaco) disponible sistémicamente, como la velocidad a la cual se presenta en la circulación sanguínea una vez cumplida la etapa de absorción desde la forma farmacéutica que lo contenía. Un protocolo experimental correctamente diseñado permitirá desligar del perfil de exposición las características de distribución y de eliminación del fármaco, y así estimar la biodisponibilidad de ambas formulaciones con la mayor fiabilidad.

Nuestra regulación sobre Intercambiabilidad de Medicamentos [2], establece claramente esta meta como finalidad de los ensayos de bioequivalencia, mencionando que con la equivalencia biofarmacéutica se esperará satisfacer la equivalencia terapéutica en la mayoría de los pacientes.

También desde esta óptica se estará ante un resultado medio de cocientes T/R que dará cuenta del rendimiento en biodisponibilidad que ambos productos, *Test* y Referencia, despliegan en el conjunto de la población, y no en todos y cada uno de los individuos. Pero a diferencia de la equivalencia terapéutica, la equivalencia biofarmacéutica no descansa su peso en las expectativas de los pacientes sino en las objetivas cualidades tecnológicas de los productos, evaluadas por el conjunto de la población. No importa aquí que el resultado del cociente de medias poblacionales

informe un atributo que quizás no se verifique en ningún sujeto “promedio”, ya que la consecuencia del ensayo no tiene necesidad de mostrarse individualmente, sino que el veredicto poblacional se centra en la verdadera cualidad que expresan las respectivas tecnologías y procesos de fabricación de los medicamentos evaluados.

La equivalencia biofarmacéutica promedio no pretende asegurarle a ningún individuo que *Test* y Referencia tendrán similares biodisponibilidades en él, sino le informa que en el conjunto de individuos la biodisponibilidad del *Test* no se apartó más de lo aceptable de la biodisponibilidad de la Referencia. Con esta meta cumplida, la población tendrá certezas de que la empresa productora del medicamento Similar aplicó a su fabricación métodos y tecnologías de similar rendimiento que el medicamento original, o Referencia. Esto es más que suficiente para autorizar la comercialización de un producto competidor. La equivalencia terapéutica en cada paciente resultará de la capacidad individual para lograrlo, siendo garantizada la intercambiabilidad a través del correcto seguimiento terapéutico que realice el médico y el eventual ajuste posológico que aplique.

Bajo este contexto de comparación de biodisponibilidades no sería incorrecto decir que un producto es más, menos, o igual a otro. Dichos juicios serán emitidos tras la evaluación que realiza la mayoría de la población, centrando el cociente T/R en un valor por encima de 1,25, por debajo de 0,8, o entre 0,8 y 1,25, respectivamente.

ENSAYO MUESTRAL E INFERENCIA POBLACIONAL

El juicio de bioequivalencia se aplica a una población que en realidad no se sometió a los productos *Test* y Referencia, sino que resultó de una inferencia realizada a partir de los resultados obtenidos en una muestra de esa población. De aquí surge la importancia que tiene la correcta selección de los voluntarios que serán sujetos de investigación.

En primera instancia corresponde considerar los aspectos éticos que están involucrados en los ensayos con seres humanos. Se ha entendido que la utilización de pacientes afecta más la ética de estos estudios que la utilización de voluntarios sanos. Individuos en tratamiento con el medicamento Referencia, u otro Similar, podrían sufrir serios desajustes terapéuticos al administrarle el medicamento *Test*, cuya biodisponibilidad se desconoce. Además, el control de las variables

introducidas en ensayos con pacientes resulta más complejo que con voluntarios sanos, aspecto que será referido seguidamente.

El cociente T/R de medias poblacionales se infiere a partir del cociente T/R de medias muestrales, alrededor del cual se construye un intervalo de confianza que proporciona una probabilidad superior o igual al noventa por ciento (IC90%) de encontrar el verdadero valor. La bioequivalencia se demuestra incluyendo el IC90% entre 0,8 y 1,25 (Figura 2). La amplitud del IC90% se reducirá en la medida que se reduzca la variabilidad aleatoria asociada al ensayo experimental (s^2), y en la medida que se aumente el número de sujetos en la muestra (n).

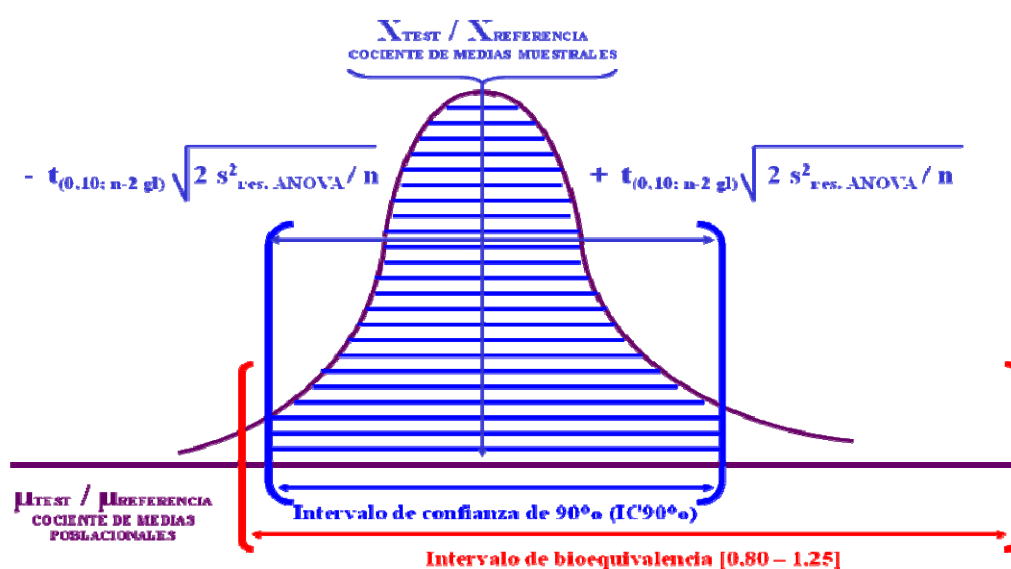


Figura 2. Distribución de probabilidad para encontrar el verdadero cociente de medias poblacionales de biodisponibilidad. La curva encierra por debajo un área que representa el 100% de probabilidad. El intervalo con probabilidad de 90% se construye a partir del cociente de medias muestrales, más la amplitud que rinde la varianza residual del ANOVA [s^2], el estadístico de la función de Student [$t(\cdot)$], y el número de sujetos [n]. La figura ilustra el caso en que *Test* y *Referencia* son bioequivalentes.

La variabilidad aleatoria del ensayo es una de las mayores preocupaciones en la investigación de bioequivalencia. En ella no sólo cuentan los errores de estimación de los parámetros de exposición sanguínea al fármaco (sean analíticos o metodológicos), sino también las naturales y variables características de los voluntarios (inter e intraindividual), además de los variables rendimientos que caracterizan a cada uno de los productos. Los mayores esfuerzos se aplican para reducir aquellas fuentes de variabilidad que no dependen de los medicamentos,

entre ellos los que aportan los sujetos de la muestra. De aquí se entiende la conveniencia de utilizar voluntarios sanos.

En el subtítulo previo se mencionó la importancia de asignarle a la mayoría de la población la fuerza para sentenciar la similar biodisponibilidad entre los productos. Este concepto asume como hipótesis que el conjunto de individuos distribuye la característica de biodisponibilidad relativa T/R según un patrón normal. Sin embargo es sabido que una determinada población puede presentar una distribución polimodal respecto a alguna característica relacionada con el fármaco. Por lo tanto habría que considerar para la bioequivalencia al grupo que contuviese la mayoría de individuos.

Existen diferentes maneras de subclasificar a los individuos: 1) por el sexo (masculino, femenino); 2) por la edad (ej.: joven, intermedio y anciano); 3) por el genotipo (de enzimas, de transportadores de membrana, etc.); 4) por el fenotipo que realmente expresa el sujeto al momento del ensayo. Sin duda que el corte según el género de los voluntarios divide la población en 2 grandes grupos con capacidades de decisión muy importantes [3, 4], que contienen a su vez elementos subclasificables por cualquiera de los restantes criterios. No existen aún definiciones respecto a la conformación de las muestras de sujetos, pero resulta claro que para armonizar este aspecto con el concepto de bioequivalencia promedio debería garantizarse un juicio con el mayor respaldo posible, sin ocultar el resultado producido por las minorías. La inclusión de estas minorías en la muestra no debería afectar improductivamente la potencia del ensayo.

CENTRADO Y VARIABILIDAD DE LAS BIODISPONIBILIDADES

Las biodisponibilidades de cada producto en la población presentan las siguientes dos cualidades: 1) centrado de valores (media), y 2) dispersión de valores (varianza). La bioequivalencia promedio se logra cuando el cociente de medias (T/R) está entre [0,80-1,25], no existiendo mención alguna en la definición respecto de las varianzas de *Test* y de Referencia.

El subtítulo previo abordaba la varianza muestral como dramático insumo para construir los intervalos de confianza del cociente de medias, pero no profundizó en el intrínseco valor de las varianzas de cada producto como decisor en

bioequivalencia. Conceptos más modernos de bioequivalencia apuntan a jerarquizar este aspecto: bioequivalencia poblacional y bioequivalencia individual [5]. No los desarrollaremos aquí, porque aún no es exigencia internacional y porque tanto el diseño experimental como el criterio de decisión son aún controversiales. No obstante, la varianza que introduce el medicamento *Test* debería considerarse como factor decisorio de similar jerarquía al valor medio que produce.

Es importante mencionar que el cociente T/R de medias aritméticas (promedios) no coincide con la media de los cocientes T/R observados en cada individuo, sea de la muestra como de la población. Sin embargo, cuando se manejan medias geométricas (raíz enésima del producto de valores individuales) la coincidencia es real.

$$\text{Media aritmética: } \frac{1}{n} \left[\sum_{i=1}^n X_i \right] \quad (\text{ecuación 1})$$

$$\text{Media geométrica: } \left[\prod_{i=1}^n X_i \right]^{1/n} \quad (\text{ecuación 2})$$

Dividir dos fórmulas expresadas según la ecuación 1, aplicadas a T y R, no rinde el mismo resultado que aplicar dicha ecuación al cociente individual (X_i) de T/R. Sin embargo, el cociente T/R de dos fórmulas según la ecuación 2, origina el mismo resultado que aplicando dicha ecuación al cociente T/R individual.

Es así que en la actualidad se procesan los datos individuales de biodisponibilidad aplicándoles la transformación logarítmica (natural o decimal). No sólo se procede de esta manera para solapar los conceptos antes mencionados, sino también porque, entre otras razones, los valores individuales de biodisponibilidad naturalmente presentan distribución logaritmo-normal [5]. El resultado lleva a una media aritmética de los logaritmos, para T y R, que no es otra cosa que el logaritmo de la media geométrica.

En resumen, la bioequivalencia promedio en realidad evalúa si el cociente de medias geométricas poblacionales se ubica en el intervalo [0,80-1,25]. Dicha inferencia se hace construyendo IC90% con el cociente T/R de medias geométricas muestrales, y con la varianza aleatoria del ensayo calculada a partir de datos logarítmicamente transformados.

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ENSAYO DE BIOEQUIVALENCIA

En primer término corresponde remarcar que el diseño de estos estudios debe evitar sesgos que puedan perjudicar u ocultar la verdadera biodisponibilidad

relativa de los productos comparados, es decir el cociente T/R de medias poblacionales. En segundo lugar, los datos que surjan del estudio deben permitir la estimación más certera de la variabilidad aleatoria, y así localizar con alta precisión el cociente T/R de medias poblacionales.

El tratamiento de datos más apropiado para los fines de bioequivalencia es el análisis de la varianza (ANOVA), el cual requiere para su mejor provecho que la mitad de los sujetos reciban los productos *Test* y Referencia en dos instancias según la secuencia TR, en tanto la otra mitad los reciba en las mismas dos instancias según la secuencia RT. Este diseño experimental recibe el nombre de ensayo cruzado en bloque de cuadrado latino 2x2 (2 productos x 2 períodos).

Por disposiciones reglamentarias, que se sustentan estadísticamente, el número de voluntarios no debe ser inferior a 12, en cuyo caso se producirán 24 datos de biodisponibilidad. El ANOVA lo que hace es reducir la varianza total, que se estimó a través de la suma de 24 diferencias cuadráticas respecto a la media global, descontando la correspondiente suma de 24 diferencias que aportaron los 12 sujetos, cada uno con 2 valores idénticos (promedio entre T y R de cada sujeto), descontando la suma de las 24 diferencias que aportaron los 2 períodos del ensayo, cada uno con 12 valores idénticos (promedio de 6 T más 6 R de cada instancia), y descontando finalmente la suma de las 24 diferencias que aportaron los 2 productos, cada uno con 12 valores idénticos (promedio de 12 T, o promedio de 12 R). La varianza que así resulta recibe el nombre de Varianza Residual del ANOVA (s^2), la cual estima la varianza poblacional (σ^2) o error aleatorio.

Como podrá advertirse, s^2 no logra estimar la verdadera variabilidad aleatoria de cada uno de los sistemas: individuo-*Test* o individuo-Referencia. Para lograrlo habría que administrar *Test* y Referencia, en 2 ensayos independientes 1x2 (1 producto x 2 períodos), utilizando los mismos voluntarios. Mejor aún en 2 ensayos independientes 1xJ, es decir cada producto administrado al sujeto en J instancias, a los efectos de realizar más correctamente el descuento de la variabilidad interindividual a la variabilidad total. Descontando a su turno la variabilidad interperíodo, se arriba a una varianza residual que estimaría correctamente la variabilidad intraindividual que produce cada medicamento, *Test* y Referencia. En estos conceptos se basan tanto la bioequivalencia poblacional como individual.

El estudio debe proveer datos que permitan extraer información de absorción relativa T/R con la menor contaminación de otras fases farmacocinéticas (distribución-eliminación), de manera que la inferencia sea circunscrita a la biodisponibilidad, y así establecer fehacientemente el juicio de equivalencia biofarmacéutica. En tal sentido, las administraciones de los medicamentos en dosis únicas evitarían alcanzar concentraciones elevadas que pudieran modificar la distribución y eliminación del fármaco. Es decir, se evitaría con este modo de administración que diferencias en concentraciones (T *versus* R) pudieran afectar el *clearance* de disposición de la droga de manera diferente, y por tanto exacerbar o enmascarar la verdadera diferencia en biodisponibilidad.

La administración de dosis múltiples, y comparación de *Test* contra Referencia en el estado estacionario, tiene la muy pregonada ventaja de hacer el ensayo en las condiciones normales de uso para muchos medicamentos. No obstante lo cual se prefiere evitar este diseño experimental por razones de seguridad de los voluntarios, a excepción de que el daño que pudiera ocasionar un inadecuado juicio de bioequivalencia fruto de un ensayo en dosis únicas fuera más importante que el riesgo corrido por los individuos del ensayo tras dosis múltiples. En Estados Unidos se exige un estudio en dosis múltiple para la evaluación de productos de liberación prolongada.

En nuestra opinión, dado que las concentraciones sistémicas, o locales en la propia ruta de ingreso al organismo, podrían amplificar o atenuar la propia biodisponibilidad de los productos, es poco interesante el diseño en dosis múltiple para concluir sobre la equivalencia biofarmacéutica. La razón que guía esta definición estratégica es la siguiente: las diferencias de biodisponibilidades deben ser consecuencia de las diferencias tecnológicas de los medicamentos y no de las diferentes concentraciones alcanzadas. Ampliaremos este concepto en las siguientes secciones.

El protocolo experimental de la investigación en bioequivalencia debe tener otros recaudos importantes: a) volumen de agua con que se ingiere la dosis; b) programación de bebidas y comidas a lo largo del ensayo; c) programación de actividades físicas para el voluntario durante el ensayo; d) programación de tomas de muestras sanguíneas u otro fluido biológico que se haya justificado utilizar; e)

preparación previa que deba seguir el voluntario antes de ingerir la dosis de medicamento; f) técnica analítica de medición de concentraciones de fármaco, con su correspondiente validación; g) forma de tratamiento farmacocinético y estadístico de los datos concentración-tiempo obtenidos; etc. Es decir, todas aquellas condiciones que permitan asegurar la menor variabilidad aleatoria al procesar la información experimental. También se requiere describir los procedimientos de reclutamiento de voluntarios sanos, y aquellas precauciones relacionadas con su seguridad durante el estudio.

PARÁMETROS RELEVANTES EN LA DETERMINACIÓN DE BIODISPONIBILIDAD

Si bien hemos desaconsejado realizar el estudio de bioequivalencia en dosis múltiple, la eventual necesidad de llevarlo a cabo en dichas condiciones requiere la mención de los siguientes parámetros de exposición, como aquellos más relevantes para cuantificar la biodisponibilidad relativa entre *Test* y Referencia:

- Concentración media de estado estacionario, la cual se obtiene dividiendo el área bajo la curva de concentraciones dentro del intervalo de administración, por la amplitud de dicho intervalo (C_{ss}).
- Concentración máxima obtenida en el intervalo de administración (C_{ssmax}).
- Concentración mínima obtenida en el intervalo de administración (C_{ssmin}).
- Oscilación pico-valle, el cual se obtiene dividiendo la diferencia entre C_{ssmax} y C_{ssmin} , por C_{ss} .
- Tiempo de máxima concentración (T_{maxss}).

El ensayo en dosis única muestra perfiles de concentración (plasmática) caracterizados por tres principales parámetros (Figura 3):

- 1) Área bajo la curva de concentraciones (AUC), sea desde cero hasta el último tiempo experimental de muestreo (AUC_0^T) o hasta tiempo infinito (AUC_0^∞). En ambos casos se procede a sumar los trapecios generados con los datos tiempo-concentración (t-C), desde cero hasta el tiempo T, agregando en el caso AUC_0^∞ la extrapolación hasta infinito. Para la extrapolación se calcula la pendiente ($-\lambda_z$) obtenida con los últimos datos t-C, que se suponen en decaimiento monoexponencial, previa transformación de C a sus respectivos logaritmos naturales. En suma, AUC_0^∞ resulta de adicionar a AUC_0^T el factor

- $C(T)/\lambda_z$, siendo $C(T)$ la concentración al último tiempo del protocolo de muestreo, T .
- 2) Concentración máxima (C_{max}), la cual se extrae de entre los valores experimentalmente obtenidos, sin realizar interpolación con funciones matemáticas de mejor ajuste.
 - 3) Tiempo de máxima concentración (T_{max}), el cual es computado en asociación con C_{max} .

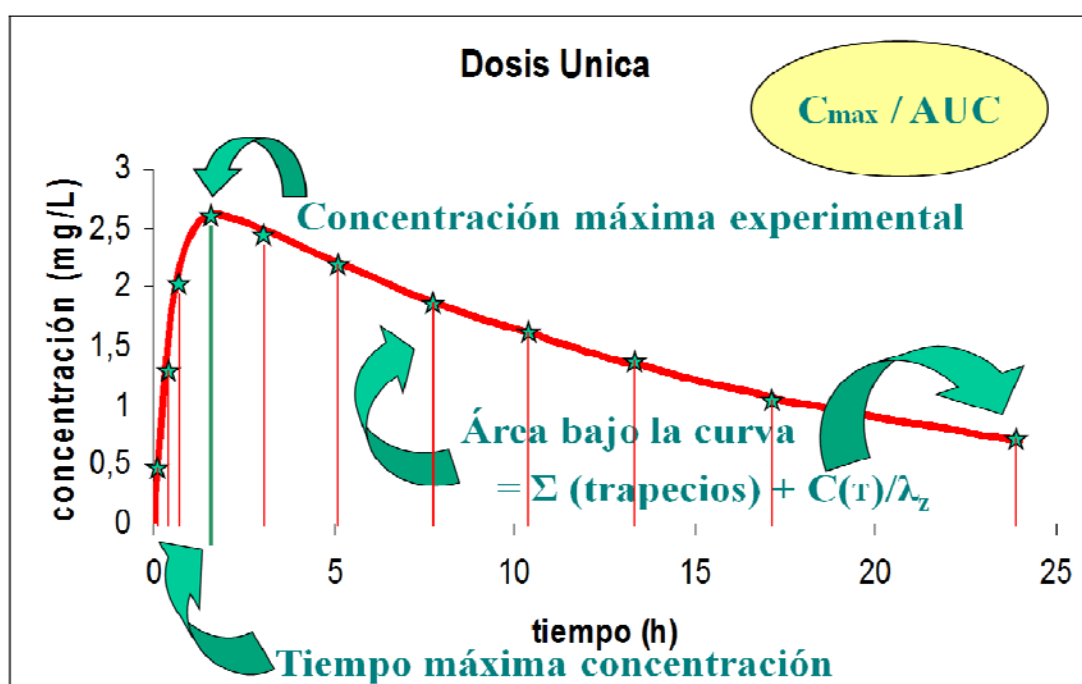


Figura 3. Perfil de niveles sistémicos de fármaco tras dosis única de *Test* o de Referencia, obtenido mediante muestreo sanguíneo a lo largo del tiempo y medición de concentraciones plasmáticas. El área bajo la curva se obtiene sumando los trapecios definidos por la unión entre las concentraciones experimentales con el eje de tiempo, y la extrapolación hasta infinito desde el último dato experimental $[C(T), T]$. Otro parámetro relevante es el cociente entre la máxima concentración y el área bajo la curva.

La velocidad de absorción determina el resultado de T_{max} y de C_{max} , adicionando este último parámetro la contribución en forma multiplicativa de la cantidad absorbida de fármaco. En tanto AUC_{0^∞} solamente es determinada por la cantidad absorbida. Ambas afirmaciones sólo son ciertas si la disposición en el sujeto fue constante en las dos administraciones (*Test* y Referencia). Por ello es tan importante asegurar la constancia del sistema fármaco-individuo, para concluir sobre la equivalencia biofarmacéutica.

Resulta apropiado en este momento indicar que la variabilidad residual del ensayo es mayor en C_{\max} que en $AUC_{0^{\infty}}$, no solo porque el primero tiene la carga de la incertidumbre analítica depositada en un único dato, y la eventual carga de incertidumbre que ocasionaría un protocolo de muestreo inadecuado para su estimación, sino porque en él contribuyen la variabilidad en la fracción de dosis que se absorbe y la variabilidad en la velocidad de absorción. Por ello ha sido considerado de interés el análisis de la información que brinda el parámetro $C_{\max}/AUC_{0^{\infty}}$, el cual desliga la contribución de la cantidad. Su inclusión para la toma de decisiones en bioequivalencia está contemplada en la regulación uruguaya [2] en los casos en que la velocidad de absorción es el tema determinante.

También comienza a tener importante peso la consideración de áreas bajo la curva parciales, desde cero hasta tiempos intermedios del protocolo experimental, a los efectos de cuantificar la velocidad relativa de ingreso de fármaco entre *Test* y Referencia. Este parámetro de exposición no será profundizado en virtud de su aplicación específica a determinados casos.

Para cerrar esta sección importa remarcar que AUC_{0^T} subroga eficientemente a $AUC_{0^{\infty}}$ cuando el muestreo se prolonga por tiempo suficiente, de modo tal que se cubra más del 80% del área total. Por lo tanto, a los efectos de evitar el incremento de la variabilidad que pudiera ocasionar la extrapolación a infinito, es común que la cantidad absorbida sea evaluada a través de AUC_{0^T} con suficiente precisión y exactitud, principalmente en formulaciones de liberación inmediata, de liberación retardada, y de liberación acelerada. No así en productos de liberación prolongada o programada a lo largo del tiempo.

FARMACOCINÉTICA NO LINEAL DOSIS Y TIEMPO DEPENDIENTE

Los sistemas medicamento-individuo responden ante cada dosis originando concentraciones en los distintos espacios corporales (respuestas farmacocinéticas) y produciendo consecuentemente efectos (respuesta farmacodinámicas).

La no linealidad respecto a las dosis significa que un aumento en la misma (sea en administración única o múltiple) lleva a un aumento mayor o menor en la concentración de fármaco ($AUC_{0^{\infty}}$ o C_{ss}). Un gráfico que relaciona $AUC_{0^{\infty}}$, o C_{ss} , con la dosis (D), o con la velocidad de administración (dosis dividido intervalo de

administración: D/F , muestra una curva cuya pendiente está compuesta por la fracción de dosis que se absorbe dividido el *clearance* sistémico del fármaco (F/CL) (Figura 4). La respuesta lineal está caracterizada por F/CL constante, aún cuando pudieran modificarse tanto F como CL de manera inversa. La respuesta no lineal se caracteriza por F/CL creciente (curva con concavidad positiva) o decreciente (curva con concavidad negativa).

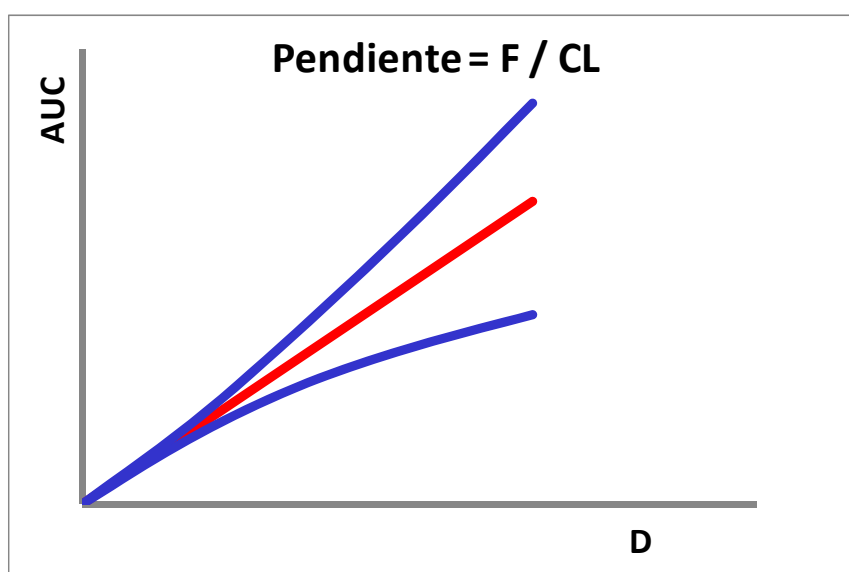


Figura 4. Relación entre el área bajo la curva (AUC) y la cantidad administrada (D) en dosis única. Sistema responde linealmente (línea roja) cuando la pendiente se mantiene constante. Sistema responde en forma no lineal (líneas azules) cuando la pendiente modifica su valor con el aumento de la dosis: a) creciendo la biodisponibilidad (F) o disminuyendo el *clearance* (CL), o ambas cosas simultáneamente, en el caso de la curva superior; b) disminuyendo F o aumentando CL , o ambas cosas simultáneamente, en el caso de la curva inferior.

Importa precisar la causa que lleva a modificar F y/o CL . Así como los efectos son causados por concentraciones de fármaco, también la acción que modifica dichos parámetros farmacocinéticos tiene su causa en las concentraciones que se logran sistémicamente (modificando el CL) o en el trayecto de ingreso al organismo (modificando el *clearance* presistémico y por lo tanto la biodisponibilidad).

Por tal motivo se prefiere trabajar con bajas dosis, evitando así que la diferencia intrínseca entre cada producto no se amplifique o se atenúe por modificaciones concentración-dependiente de los *clearance* presistémicos y/o sistémicos.

La no linealidad tiempo dependiente refiere a que F y/o CL se modifica a lo largo de una administración crónica. Esto lleva a que la cinética del fármaco no sea la misma entre la primera dosis administrada y la dosis que está manteniendo concentraciones de estado estacionario. Nuevamente es la concentración de fármaco, en los sitios involucrados con el *clearance* presistémico y sistémico, la responsable de tal fenómeno. La única particularidad de este caso lo constituye el tiempo que demandó observar el efecto de tal acción.

Por este motivo se prefiere trabajar en dosis única, evitando así que la diferencia intrínseca entre cada producto no se amplifique o se atenúe por modificaciones concentración-dependiente que se evidencian con el transcurso del tiempo y la reiterada exposición al fármaco, agente causante de la modificación del *clearance* presistémico y sistémico.

LIBERACIÓN DE FÁRMACO ETAPA PREVIA A LA ABSORCIÓN

Este aspecto fundamenta buena parte de la tendencia actual que busca evitar los ensayos clínicos de bioequivalencia (bioexención). En determinados casos se acepta que la equivalencia biofarmacéutica sea dirimida a través de estudios de disolución *in vitro* comparativos entre *Test* y Referencia [1].

El concepto de bioexención principalmente tuvo su desarrollo en medicamentos destinados a la vía de administración oral. Se supone que si la disolución es el paso previo y determinante de la absorción, las diferencias que allí se constaten entre *Test* y Referencia tendrán directa consecuencia sobre la bioequivalencia. Se requieren importantes estudios de correlación *in vitro* – *in vivo*, a los efectos de pautar correctamente el traslado de los límites de la equivalencia *in vivo* a la equivalencia *in vitro*. La mayor dificultad que plantea este procedimiento es reproducir *in vitro* la compleja fisiología gastrointestinal.

No desarrollaremos en este texto el contenido de esta importante faceta de la equivalencia biofarmacéutica, no por irrelevante, sino porque se necesita acumular más experiencia con esta estrategia. Sin duda que esta metodología permitirá reducir fuertemente los costos económicos y éticos de la puesta en el mercado de medicamentos similares.

CONCLUSIONES

La intercambiabilidad de medicamentos tiene sustento en la similar biodisponibilidad promedio que mostraron dos productos según medición que hizo la población de potenciales consumidores. Cuando exista alta probabilidad de que las biodisponibilidades relativas, *Test vs. Referencia*, no puedan ser afectadas más que por la disolución que se llevará a cabo en el tracto digestivo, será posible subrogar el ensayo clínico de bioequivalencia por estudios comparativos de disolución *in vitro*. La intercambiabilidad entonces refiere a una equivalencia biofarmacéutica entre dos productos lograda gracias a similares tecnologías de fabricación, sin con ello asegurar en cada individuo la intercambiabilidad durante sus usos clínicos.

En la medida de que los pacientes reproduzcan las biodisponibilidades medias que mostraron ambos medicamentos en el ensayo *in vivo*, o en el estudio *in vitro*, se estará frente a una muy probable equivalencia terapéutica cuando se sustituya un producto por el otro siguiendo el mismo plan posológico. El riesgo de no intercambiabilidad clínica está siempre presente entre medicamentos bioequivalentes, y por ello necesariamente deben evaluarse los resultados terapéuticos tras el cambio de producto. Pese a este eventual inconveniente, el estudio de bioequivalencia será siempre un avance para la sociedad, dado que permite la libre competencia entre Empresas con similar capacidad productiva, y permite a los consumidores ejercer la libre elección entre medicamentos similares, sin los riesgos que siempre oculta la ignorancia.

REFERENCIAS

1. Fortieth Report of the World Health Organization. Technical Report Series N° 937, Annex 7: *Multisource (generic) pharmaceutical products: guideline on registration requirements to establish interchangeability*. Geneva, 2006, pp 347-90.
2. Decreto del Poder Ejecutivo. Ministerio de Salud Pública de Uruguay. Montevideo, 12 de enero de 2007, 24 páginas.
3. Fagiolino P, González N, Vázquez M, Eiraldi R: Itraconazole bioequivalence revisited: Influence of gender on highly variable drugs. *Open Drug Metab J* 2007; 1: 7-13.
4. González N, Fagiolino P, Vázquez M, Eiraldi R: Bioequivalencia promedio teniendo en cuenta el género de los sujetos. *Lat Am J Pharm* 2009; 28: 843-51.
5. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Statistical approaches to establishing bioequivalence*. U.S. Department of Health and Human Services. FDA/CDER, January 2001.

INFLUENCIA DEL GÉNERO, DEL ENVEJECIMIENTO, Y DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN LA FARMACOCINÉTICA DE LAS DROGAS

Vázquez M, Fagiolino P, Eiraldi R, Maldonado C.

Departamento de Farmacología y Biofarmacéutica, Facultad de Química, Universidad de la República de Uruguay, Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de un tratamiento farmacológico es conseguir el efecto deseado sin provocar toxicidad al paciente. La respuesta que se espera al administrar una determinada dosis va a depender de numerosos factores, muchos de ellos inherentes a cada persona, como el género, raza, factores genéticos que explican la variabilidad farmacodinámica y farmacocinética. Otras veces, es el estado clínico del propio paciente el que produce modificaciones farmacodinámicas y farmacocinéticas, posesionándonos frente a sistemas altamente variables por la dinámica evolución de la patología del individuo y por la presencia del fármaco del que se pretende que incida en la clínica del paciente revirtiéndola (Vázquez *et al.*, 2008). La hora del día, así como la variedad de interacciones fármaco-fármaco, fármaco-alimento, fármaco-planta medicinal deben ser consideradas como variables adicionales que influyen la cinética de un fármaco.

Las razones para una respuesta alterada a los fármacos en el anciano pueden ser farmacocinéticas o farmacodinámicas y en resumidas cuentas la absorción y disposición de fármacos puede verse modificada o el individuo puede reaccionar en forma diferente a una concentración dada. La influencia de las patologías en el accionar de los fármacos no será tratada en este capítulo, en donde prestaremos especial atención además de la influencia del género y de los ritmos circadianos sobre la respuesta farmacocinética, a cambios durante el envejecimiento “normal”,

pudiendo resultar en muchos casos difícil la distinción entre el envejecimiento *per se* y los síntomas de la propia patología.

FISIOLOGÍA DEL ENVEJECIMIENTO

A pesar de que son varios los cambios que experimenta el organismo humano con el paso del tiempo, sólo nos enfocaremos en este capítulo a aquellos de gran impacto en la biodisponibilidad y disposición de fármacos

Una de las características del envejecimiento es un declive progresivo de los mecanismos homeostáticos y autorreguladores que mantienen la temperatura corporal, el pH sanguíneo, la presión arterial, la perfusión sanguínea de los distintos órganos o la frecuencia cardíaca. Por lo tanto, muchos de los efectos que pueden producir los fármacos no son mitigados y la intensidad de los efectos adversos resulta mayor (hipotensión postural, hipovolemia, cambios electrolíticos en respuesta a diuréticos, etc.) que en el individuo joven.

Quizás la característica más sobresaliente en la edad avanzada es la rigidez progresiva de los tejidos. Se observa una pérdida importante de la distensibilidad vascular con la edad, lo que conjuntamente con el aumento del grosor de la íntima de los vasos y disfunción endotelial parece ser responsable de un aumento de la presión arterial sistólica y de la carga del ventrículo izquierdo (Turnheim, 1998). Esto conlleva a un enlentecimiento del llenado diastólico y a una disminución del gasto cardíaco en un 1% cada año después de la edad de 25 años (McElnay *et al.*, 1996). Sin embargo, la distribución del gasto cardíaco no permanece constante. Mientras que la contribución del flujo sanguíneo total a los riñones y al tracto gastrointestinal (órganos esplácnicos excepto el hígado) está reducida en el anciano, el cerebro y el miocardio reciben una fracción de gasto cardíaco mayor (McElnay *et al.*, 1996).

Pero a su vez este gasto cardíaco disminuido en forma constante pone en funcionamiento mecanismos compensatorios como el sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona-vasopresina. Como resultado, se produce una elevación de las catecolaminas circulantes (Cheitlin, 2003) llevando a una regulación descendente de receptores beta adrenérgicos.

El flujo sanguíneo hepático disminuye en forma similar al gasto cardíaco, pero la fracción de flujo sanguíneo permanece constante, ya que una fracción de flujo sanguíneo arterial más alta se compensa por una fracción reducida de la vena porta (Le Couter *et al.*, 1998).

La funcionalidad renal declina con la edad en concordancia con un flujo sanguíneo renal disminuido y por este motivo es que los ancianos deberían ser tratados como pacientes insuficientes renales. La funcionalidad renal promedio de un individuo de 80 años de edad es sólo 50 a 60% de la de un individuo de 20 años (Turnheim, 1998). El nivel de creatinina sérica permanece comparativamente constante hasta edad avanzada debido a reducciones paralelas en la masa muscular esquelética (la principal fuente de creatinina endógena) y la función excretoria renal, por lo tanto la medida de la misma puede carecer de significado clínico en el anciano.

En lo que refiere al contenido y actividad de enzimas del sistema citocromo P450 (CYP) en el anciano, la literatura es controversial. El contenido de las enzimas CYP parece permanecer inalterado en edad avanzada (Turnheim, 1998). Varios autores han demostrado que la actividad de la isoenzima CYP3A4 permanece sin cambio con la edad, a pesar de que los *clearances* de ciertos fármacos metabolizados por dicha enzima están disminuidos en el anciano (Hunt *et al.*, 1992; Schmucker, 2001).

También es escasa la información acerca de la expresión de los transportadores de eflujo (P-glicoproteína [Pgp], proteína asociada a resistencia de múltiples drogas [MRP2]) en el anciano. Brenner y colaboradores, encontraron que la función de la Pgp estaba bien preservada en pacientes de edad avanzada mientras que otros autores (Bartels *et al.*, 2009) demostraron un descenso en la función de la Pgp a nivel cerebrovascular en el anciano lo cual podría ser un mecanismo que explicara por qué la vejez es el principal factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

La incidencia de aclorhidria aumenta con la edad así como se observa un enlentecimiento del vaciamiento gástrico, una disminución de las secreciones gastrointestinales y del peristaltismo intestinal (Turnheim, 2003).

Aparte de la concentración en el sitio de acción, la magnitud del efecto de un fármaco depende del número de receptores en el órgano blanco. Por lo tanto, además de la farmacocinética, la farmacodinamia puede estar alterada en el anciano.

Ya se mencionó anteriormente la disminución en el número de receptores β adrenérgicos. La edad parece no tener efecto en la respuesta de adrenoreceptores α_1 , mientras que los efectos de los receptores α_2 y la actividad de los muscarínicos están disminuidos.

El contenido de neurotransmisores en el cerebro varía entre diferentes regiones del cerebro y a su vez se constata una disminución en el número de sinapsis. La función cognitiva se relaciona con transmisión colinérgica en el sistema nervioso central (Tumer *et al.*, 1992). Una reducción de la enzima colina acetil-transferasa se encontró en la neocorteza de personas ancianas lo que lleva a una disminución del contenido de acetilcolina. También otros neurotransmisores están reducidos como es el caso de la dopamina.

Biodisponibilidad de fármacos y envejecimiento

La disolución representa la primera fase del proceso de absorción cuando se administra un fármaco por vía oral.

La misma puede estar comprometida para algunos fármacos en el anciano debido a la menor secreción de ácido clorhídrico y de pepsina hacia el tracto digestivo que experimenta. Esto se puede deber a un menor flujo sanguíneo regional (o sea en la zona esplácnica), así como a un menor contenido de acetilcolina y de receptores muscarínicos que se da en la edad avanzada.

Una vez que el fármaco se ha disuelto, está posibilitado a ser absorbido. La etapa de absorción ocurre predominantemente en el intestino delgado.

La mucosa gastrointestinal contiene varias enzimas que contribuyen al efecto del primer pasaje y por lo tanto a la biodisponibilidad de los medicamentos (Kaminsky *et al.*, 2003; Gibbs *et al.*, 2003). A su vez, se puede hablar de una acción concertada entre CYP y los transportadores de eflujo que se ubican en la membrana apical del enterocito (Kivisto *et al.*, 2004).

Una disminución del flujo sanguíneo a la zona esplácnica puede llevar a una disminución de la eliminación sistémica en el anciano. Asimismo, si en realidad existieran menos transportadores de eflujo en esta franja etaria, como algunos autores establecen a nivel central, la mayor concentración de soluto que invade al enterocito podría saturar las enzimas allí presentes llevando a un aumento de biodisponibilidad.

Clearance de fármacos y envejecimiento

La extracción de un fármaco por un órgano es alta, intermedia o baja dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Por lo tanto, las drogas pueden ser clasificadas de alta o baja extracción. En el caso de las de alta extracción, la eliminación depende del flujo sanguíneo que pasa por el órgano. En el caso que la droga sea de baja extracción, la fracción de droga no unida y el *clearance* intrínscico son los factores a tener en cuenta para predecir su eliminación. Ya que el gasto cardiaco está disminuido en el anciano se explica un menor *clearance* para drogas de alta extracción. Sin embargo, algunas drogas de baja extracción (teofilina, fenobarbital o carbamacepina) muestran una reducción del *clearance* dependiente de la edad (Le Couter, 1998; Schmucker, 2001; Bernus, 1997). Algunos otros fármacos de esta misma categoría muestran un *clearance* incambiado en personas de edad avanzada (diazepam, ácido valproico y fenitoína) (Turnheim, 2003).

La excreción renal no debe ser ignorada al momento de analizar el problema ya que puede representar una proporción importante de fármaco eliminado.

En el caso de la digoxina, cuya excreción renal representa el 80 % del *clearance* total (Hanratty *et al.*, 2000) y su extracción por el riñón no es alta, su eliminación corre en paralelo a la fracción del flujo sanguíneo renal. Cuanto más flujo sanguíneo recibe el órgano, más rápido es la salida de las moléculas al espacio extravascular (Fagiolino, 2002). Esto implica que la eliminación de la misma estará más reducida en el anciano.

Podríamos, entonces, referirnos al impacto que representa la distribución del gasto cardiaco en la eliminación de fármacos (Fagiolino, 2006). Considerando lo discutido en la sección previa que los individuos ancianos tienen similar fracción de flujo sanguíneo hepático y fracción del mismo disminuido a la zona esplácnica y renal, es que pasaremos a explicar la eliminación de algunos fármacos de baja extracción.

La teofilina es metabolizada en el hígado por la CYP1A2 (Turnheim, 1998), pero la excreción renal representa un 15% del *clearance* total (Tang-Liu, 1982).

Por lo tanto, los ancianos presentan *clearance* disminuido debido a una excreción renal disminuida.

Tal es el caso del fenobarbital que se metaboliza por la CYP2C9 y cuya excreción renal es importante.

La carbamacepina es un sustrato de CYP3A4 y de MRP2, esto explica por qué este fármaco presenta metabolismo intestinal y hepático. Por lo tanto el *clearance* de la misma está disminuido en el anciano debido a una reducción del *clearance* intestinal.

El *clearance* de fenitoína y ácido valproico permanece incambiado con la edad. Si bien ambos fármacos son ampliamente metabolizados y son sustratos de transportadores de flujo, las enzimas que lo metabolizan no se encuentran en el enterocito, por lo tanto una disminución de flujo sanguíneo a esa zona no va a traer aparejado una disminución en el *clearance*. A pesar que el diacepam es metabolizado por la CYP3A4, no se ha referenciado en la literatura que sea sustrato de transportadores, consecuentemente su *clearance* permanece incambiado con la edad.

Tabla I. *Clearance* de fármacos en ancianos

Eliminación	<i>Clearance</i> reducido	<i>Clearance</i> incambiado
Renal (predominantemente)	Digoxina	
Renal y hepática	Teofilina y fenobarbital	
Hepática e intestinal	Carbamacepina	
Hepática y sustratos de transportadores de eflujo		Fenitoína y ácido valproico
Hepático e intestinal y no sustrato de transportadores		Diacepam

Relación tejido/plasma de concentración de fármaco en el envejecimiento

Ya que el flujo sanguíneo hacia el cerebro está aumentado en el anciano en comparación con sujetos jóvenes y se ha encontrado una menor expresión de transportadores de eflujo a este nivel, es de esperar concentraciones en el sistema nervioso central más altas, lo que explicaría la mayor sensibilidad a agentes hipnóticos y ansiolíticos en este grupo etario (Hämmerlein, 1998; Greenblatt, 1991). Aún así, se podría decir que la distinta distribución de flujo sanguíneo es el factor determinante ya que se ha observado una mayor sensibilidad a la acción de

sedación del diazepam en pacientes añosos (Hämmerlein, 1998) y este fármaco, como se expuso anteriormente, no es sustrato de transportadores de eflujo.

La fracción del flujo sanguíneo cardiaco también está aumentada y esto podría explicar la toxicidad cardiaca de ciertas drogas con acción a nivel cardiaco durante la vejez (Miura, 2000; Sowinski, 1995)

EL SER HUMANO: MÁQUINA DEL TIEMPO

Nuestra vida está regida por una serie de ciclos recurrentes. Estamos adaptados a estos ciclos y funcionamos adecuadamente porque nuestra fisiología, nuestro comportamiento, la biología celular y los fenómenos moleculares están sometidos a cambios rítmicos generados internamente por un reloj biológico que está sincronizado con el entorno. Reloj biológico que en los mamíferos se sitúa en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo.

El cuándo suceden las cosas es una variable fundamental para comprender nuestro organismo, sus trastornos patológicos y enfoques venideros en los tratamientos terapéuticos. Así nace, la Cronobiología, como ciencia joven que estudia estos ritmos en las funciones corporales.

La adaptación a un planeta que gira con un periodo de 24 horas condiciona a la presencia de ritmos diarios. La vida es un movimiento permanente, es fluctuante y sobre todo rítmica (ciclos de las estaciones, ciclos diarios de luz-oscuridad). Sin embargo, no todos son días en la Cronobiología. Los ritmos **ultradianos**, característicos de actividades neurales y endócrinas, presentan períodos en el rango de segundos, minutos y horas. Los ritmos **infradianos** tienen períodos mayores a 1 día (semanas, meses, años). Los ritmos **circadianos**, objetivo principal de este capítulo, presentan periodos cercanos a las 24 horas.

Este concepto de variaciones periódicas en las funciones orgánicas entra en conflicto con la teoría homeostática postulada inicialmente por Claude Bernard y acuñado posteriormente el término homeostático con el biólogo Walter Cannon (Caponi, 2001). Compatibilizando conceptos es que se habla de homeostasis reactiva y predictiva. Esta última incluye a los ritmos biológicos y es la forma de adaptarse en respuesta al medio ambiente fluctuante. Por ejemplo, la secreción de cortisol se

observa unas horas antes del comienzo de la vigilia, de forma tal de ir preparando al organismo para el despertar.

Ritmos circadianos en funciones fisiológicas y enfermedades

Todas nuestras funciones están gobernadas, por lo general, por un control diario, en armonía interna que nos conduce a una mejor preparación para las distintas horas del día (Ohdo, 2007). Antes del amanecer se activa el sistema nervioso simpático. El cortisol, la aldosterona, testosterona, la adhesividad de plaquetas, la viscosidad sanguínea, la actividad de las células “*natural killer*” (NK) presentan sus picos a primeras horas de la mañana. Los picos de insulina, colesterol, triglicéridos y ácido úrico ocurren tarde en el día o al comienzo del periodo nocturno. Los ritmos de secreción de ácido gástrico, de linfocitos, prolactina, melatonina, eosinófilos, hormona luteinizante, folículo estimulante entre otros muestran picos a horas específicas durante la noche (Figura 1a).

Diversas patologías como asma y otros procesos alérgicos se ponen de manifiesto en las primeras horas del día así como la migraña. La morbi-mortalidad asociada al infarto de miocardio así como la incidencia de accidentes trombóticos es mayor durante la primeras horas de la mañana (Ohdo, 2010). (Figura 1b)

El conocimiento de que muchos parámetros fisiológicos se organizan en función del tiempo, establece que no sólo es necesaria la cantidad correcta de un medicamento sino también administrarla en el tiempo correcto, llegándose al término de cronoterapia en la cual se propone una sincronización de las concentraciones de fármaco en el organismo a los ritmos de la actividad patológica (Hermida, 2007).

Biodisponibilidad de fármacos y ritmos circadianos

La secreción gástrica y el pH, la motilidad gastrointestinal, el tiempo de vaciamiento gástrico, el flujo sanguíneo esplácnico y quizás el sistema enzimático y/o los transportadores de eflujo (Ando et al., 2005) varían de acuerdo a la hora del día, lo que puede contribuir en forma importante a la biodisponibilidad de los fármacos. Por ejemplo, ritmos circadianos en el pH pueden inducir modificación en la ionización de fármacos de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas.

Una característica común en el ciclo día-noche es un tono simpático más alto en la mañana que en la noche. Esto se puede resumir como un gasto cardiaco elevado y una distribución de flujo sanguíneo a regiones extra-esplácnica-renal aumentada en

la mañana en comparación con la noche, conduciendo a un incremento en la velocidad de absorción de fármacos. Los horarios de comidas constituyen la excepción, en dónde las regiones esplácnicas reciben una mayor distribución de gasto cardiaco de forma tal de facilitar la digestión de la comida.

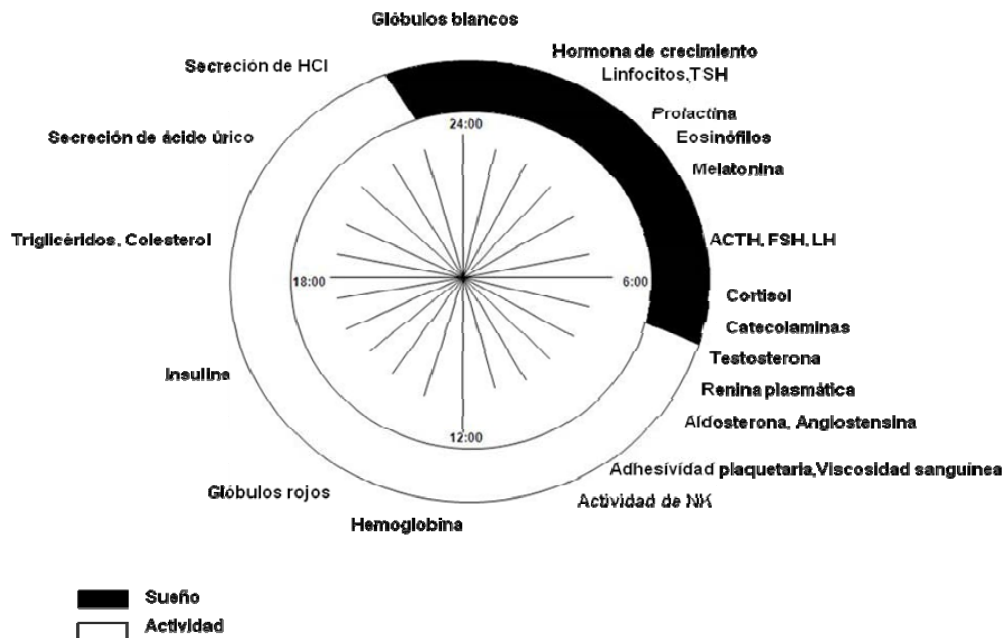


Figura 1a. Diagrama de un reloj de 24 horas que muestra las horas en donde se manifiestan los picos de variables fisiológicas.

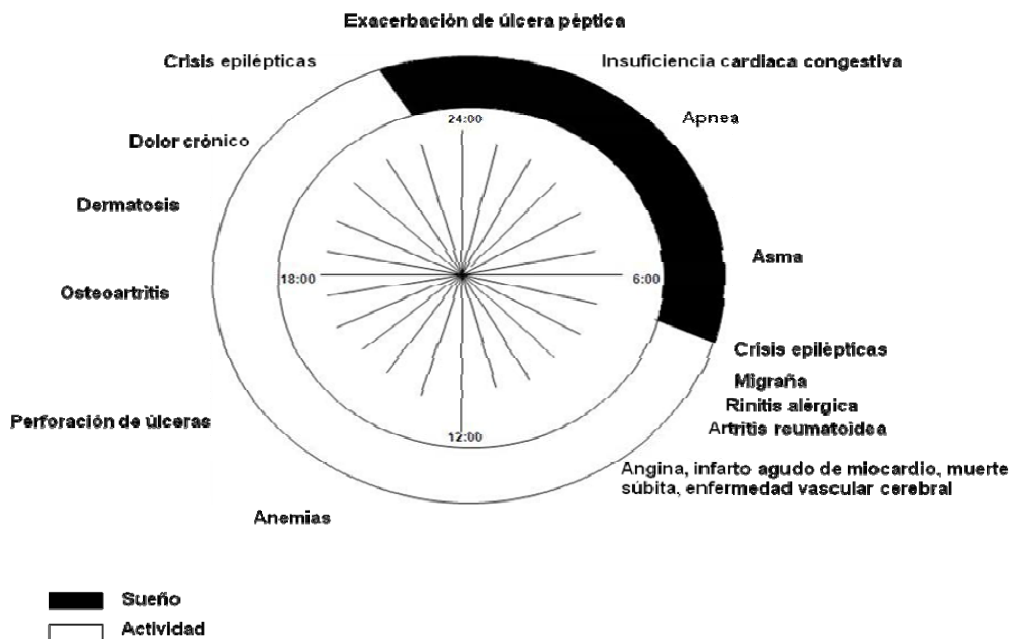


Figura 1b. Diagrama de un reloj de 24 horas que muestra las horas en donde se manifiestan los síntomas o eventos agudos de algunas patologías.

Ritmos circadianos y *clearance*

Algunos fármacos no experimentan cambios de *clearance* entre el día y la noche. Tal es el caso del mononitrato de isosorbide (Lemmer *et al.*, 1991).

Otros sí presentan *clearance* diferentes. A pesar de que varios procesos involucrados en la disposición de drogas pueden cambiar durante el día, quizás el efecto sobre las concentraciones de fármacos podrá apreciarse o no en su estado final de acuerdo al tiempo requerido en equilibrarse el sistema.

Para aquellos fármacos de rápido equilibrio entre compartimientos, semividas de eliminación ($t_{1/2}$) cortas y alta extracción por el órgano eliminador, será posible observar la consecuencia del cambio dentro del período estudiado. Como ejemplo podemos citar al propranolol, al dinitrato de isosorbide y a la nifedipina con $t_{1/2}$ cortas, cuyas concentraciones en plasma resultaron ser más bajas durante la noche (Lemmer *et al.*, 1991). Esto está de acuerdo con la mayor fracción de flujo sanguíneo destinada al intestino durante horas nocturnas.

La situación con fármacos de $t_{1/2}$ largas es diferente ya que los sistemas cambian cíclicamente debido a cambios circadianos en la redistribución de flujos sanguíneos y quizás el nuevo estado estacionario no se alcance antes de que ocurra el próximo cambio. Esto puede llevar a que fármacos con *clearance* más bajo durante el día muestren paradójicamente concentraciones más bajas en este periodo. La carbamacepina, anticonvulsivante de larga $t_{1/2}$ y con metabolismo tanto hepático como intestinal, se puede mencionar como ejemplo. En un estudio realizado en humanos después de una administración oral única, se observaron niveles de carbamacepina y de su metabolito epóxido, más altos durante la noche (Olano *et al.*, 1998). La vía metabólica de carbamacepina no mostró cambios en ambos periodos y la fracción libre de la carbamacepina y su metabolito permaneció inalterada antes y después de la administración de comida y en la transición noche-día. Otra vez más, las variaciones en el flujo sanguíneo parecen ser la causa de las diferentes concentraciones observadas.

Esto lleva a postular que la carbamacepina y el epóxido están más distribuidos fuera del espacio intravascular durante el día, debido a un aumento del flujo sanguíneo a órganos periféricos conduciendo a concentraciones sanguíneas disminuidas del fármaco y su metabolito durante este lapso. Esta fuerza parece ser más importante

que la salida del organismo, si no fuera así se hubieran encontrado niveles en la noche más bajos en comparación al día.

Otro ejemplo interesante a resaltar, referenciado en la literatura (St-Pierre *et al.*, 1985), es un estudio con teofilina en el cual se observó una más rápida eliminación después de la administración diurna, pero realmente la $t_{1/2}$ fue calculada la siguiente noche. Por lo tanto la conclusión sería una más rápida eliminación en la noche lo que coincide con un mayor flujo sanguíneo renal nocturno de un fármaco, que es parcialmente eliminado por excreción renal. De acuerdo a esto podríamos decir que los datos farmacocinéticos en los estudios cronofarmacocinéticos deben ser manejados con cautela. En particular, las $t_{1/2}$ deben ser calculadas a partir de las curvas concentración-tiempo que muestran caída monoexponencial durante el periodo a ser evaluado.

Ritmos circadianos de la relación tisular/plasmática de concentración del fármaco

La actividad física durante las horas de la mañana puede influenciar la distribución de gasto cardiaco. La influencia que el ejercicio ejerce sobre la respuesta farmacocinética fue referenciada para la digoxina (Jogstrand *et al.*, 1981), con la que se veía un cambio significativo en la relación tejido/concentración plasmática durante el ejercicio. La mayor captación de digoxina por el músculo esquelético concuerda con la fracción de flujo sanguíneo aumentada hacia el músculo durante la actividad física y con una disminución de la misma a otras regiones como son los riñones. Ya que el corazón trabaja más durante el ejercicio, y la actividad física normalmente se lleva a cabo en horario diurno, la relación tejido/plasma sería más alta en el miocardio y el músculo esquelético durante este periodo, en detrimento de otros órganos tales como riñones y tracto gastrointestinal.

FISIOLOGÍA HOMBRE-MUJER

Diversos estudios (Tanaka, 1999; Meibohm *et al.*, 2002; Beierle *et al.*, 1999) han demostrado la influencia del género en la farmacocinética de los fármacos, ya sea en la absorción o disposición de los mismos.

Características distintivas encontradas en mujeres, se deben en su mayoría, a razones hormonales que determinan la distinta composición corporal, el distinto

contenido y actividad de las enzimas intestinales y hepáticas, así como de los transportadores de membrana.

Tradicionalmente, diferencias entre hombres y mujeres han sido atribuidas a morfología corporal, tamaño y composición. La diferencia sólo en peso corporal puede ser la causante de la mayoría de diferencias observadas en los niveles de fármacos, y la respuesta o toxicidad a los mismos, pues la mayoría de las drogas son administradas a la misma dosis en todos los sujetos adultos independientemente del sexo y del peso corporal. Sabido es el menor peso corporal de las mujeres, pero aún después de normalizar por peso, persisten muchas diferencias.

Diferencias en biodisponibilidad oral pueden ser causadas por la diferente secreción ácida y motilidad gástrica entre ambos sexos (Meibohm *et al.*, 2002), así como la diferente actividad de las principales enzimas y/o transportadores intestinales y hepáticos.

Las mujeres presentan un mayor contenido de tejido adiposo y menor masa muscular en relación a los hombres. El mayor contenido de grasa corporal puede llevar a un mayor volumen de distribución en las mujeres para fármacos lipofílicos, conduciendo quizás a una duración mayor del efecto (Anderson, 2005).

La mayor masa muscular que presentan los hombres, considerando el mismo peso corporal, es la razón por la cual una mayor fracción de flujo sanguíneo está destinado a los músculos (Soldin *et al.*, 2009) y consecuentemente una más baja fracción de flujo sanguíneo deriva a la zona esplácnica.

Debido a la incidencia de la distribución de gasto cardiaco en la disposición de fármacos, (Fagiolino *et al.*, 2006), un *clearance* más alto y una semivida de eliminación más baja debería de observarse en mujeres para fármacos de eliminación metabólica.

Sin embargo, las enzimas metabólicas y/o transportadores de eflujo deben ser incorporados al momento de analizar los factores determinantes ya que los mismos pueden aumentar, reducir o aún revertir la diferencia en *clearance* predicha sólo teniendo en cuenta las bases fisiológicas y cardiovasculares.

El transporte hepatobiliar de sustratos de MRP2 es más alto en mujeres que en hombres (Rost *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2006), conduciendo esto a una secreción desde el hepatocito a la bilis aumentada en el sexo femenino.

La implicancia de este factor en el *clearance* de los fármacos dependerá de las enzimas implicadas en el metabolismo del fármaco en sí, pudiendo presentar las mujeres un *clearance* aumentado o disminuido en comparación con el sexo masculino.

A su vez las mujeres presentan una mayor expresión de CYP3A4 en comparación con los hombres (Tanaka, 1999), mientras que la actividad de otras isoenzimas CYP (CYP2C19, CYP2D6, y CYP2E1), así como las reacciones de conjugación (glucuronidación) son más altas en el hombre (Tanaka, 1999; Meibohm *et al.*, 2002). Algunos autores (Meibohm *et al.*, 2002) encontraron que la actividad de la Pgp era menor en mujeres que en hombres. Esta expresión recíproca entre este transportador y la CYP3A4, comúnmente actuando en forma concertada, puede compensar las posibles diferencias en este sentido entre hombres y mujeres.

Es importante remarcar que el contenido de CYP3A4 es mayor en el intestino que en el hígado (Von Richter *et al.*, 2004).

Asimismo, fluctuaciones hormonales dentro del ciclo menstrual pueden influenciar la absorción y disposición de fármacos (Kashuba *et al.*, 1998).

La progesterona fue identificada como la principal responsable de cambios en la motilidad intestinal y en el flujo biliar que suceden durante el embarazo y el ciclo menstrual (Baron *et al.*, 1993; Tierney *et al.*, 1999).

El receptor X de pregnano, un miembro de los receptores nucleares, ha mostrado mediar los efectos genómicos de la progesterona y el estradiol en la expresión de la familia de genes del citocromo P-450 (Masuyama *et al.*, 2003). Estas hormonas sexuales están presentes en mayor proporción en mujeres que en hombres participando del control del ciclo menstrual.

Las fluctuaciones hormonales y su consecuencia en la actividad metabólica, hacen que las mujeres pre menopáusicas sean menos constantes que los hombres.

A su vez, la acción de la testosterona en el hombre provoca una regulación descendente de los transportadores de eflujo MRP2 en el hepatocito (Suzuki *et al.*, 2006).

El uso de anticonceptivos orales en las mujeres tienden a reducir el *clearance* para fármacos metabolizados por reacciones de oxidación y producir un efecto inductivo en la actividad de la glucuronosil-transferasa (Galimberti *et al.*, 2006).

Diferencia de género en biodisponibilidad y *clearance*

La diferencia en la secreción ácida puede comprometer la disolución de fármacos y por ende su absorción. Un estudio realizado en 24 voluntarios sanos (12 hombres y 12 mujeres) que recibieron itraconazol en ayunas, permitió concluir que la mujeres presentan menor biodisponibilidad oral y áreas bajo las curva concentración plasmática-tiempo más variables que los hombres (Fagiolino *et al.*, 2007). La baja biodisponibilidad parece estar relacionada al mayor pH estomacal observado en mujeres, y la variabilidad, con la incidencia del ciclo menstrual en el pH y la expresión del CYP3A4. Los hombres pueden disolver esta droga con mayor eficacia y las más elevadas concentraciones de la misma que llegan al intestino delgado pueden llegar a saturar el transportador y las enzimas. El itraconazol es un sustrato de la Pgp (Keogh *et al.*, 2006), y es metabolizado por la CYP3A4. Esto podría llevar a resultados similares entre géneros por la acción concertada que presenta la enzima y el transportador. En este trabajo se observó que la diferencia entre ambos géneros no está relacionada a la velocidad de eliminación del fármaco.

Estudios preliminares realizados por nuestro grupo con dos anticonvulsivantes: ácido valproico (Ibarra *et al.*, 2010) y carbamacepina (Maldonado *et al.*, 2010) arrojaron diferencias entre géneros. Tanto el valproato como la carbamacepina son eliminados a través de rutas metabólicas, por lo tanto se esperaría un *clearance* más elevado de ambos fármacos en mujeres como consecuencia de una mayor fracción de flujo sanguíneo destinado a la zona esplácnica y de una mayor expresión de MRP2 a nivel de la membrana hepatobiliar.

En el caso de la carbamacepina, sustrato además de la CYP3A, las mujeres presentaron una mayor constante de eliminación sin embargo no se observaron diferencias significativas en el *clearance* aparente (Cl/F). Esta similitud encontrada y para compensar el *clearance* más alto en mujeres, se explicaría necesariamente por una diferente biodisponibilidad oral. Biodisponibilidad oral más alta que se observaría en el sexo femenino por recibir una mayor dosis por kilogramo de peso corporal con altas probabilidades de saturar tanto el transportador como la enzima. En lo que refiere al valproico, se observó un *clearance* mayor en el hombre en oposición a lo que se preveía cardiológicamente. Al ser el ácido valproico sustrato de MRP2, su secreción estaría aumentada desde el hepatocito hacia la bilis

en mujeres, evitando el metabolismo hepático y permaneciendo por más tiempo en su organismo. Sin embargo el uso de anticonceptivos puede enmascarar este efecto metabólico ya que aumenta la eliminación de valproato por medio de la conjugación con glucurónido.

CONCLUSIONES

Tomando como base la fisiología cardiovascular, las diferencias farmacocinéticas previamente discutidas entre hombre y mujer, día y noche, anciano y joven, pueden ser ilustrados en la Figura 2, la cual anticiparía el *clearance* en cada circunstancia.

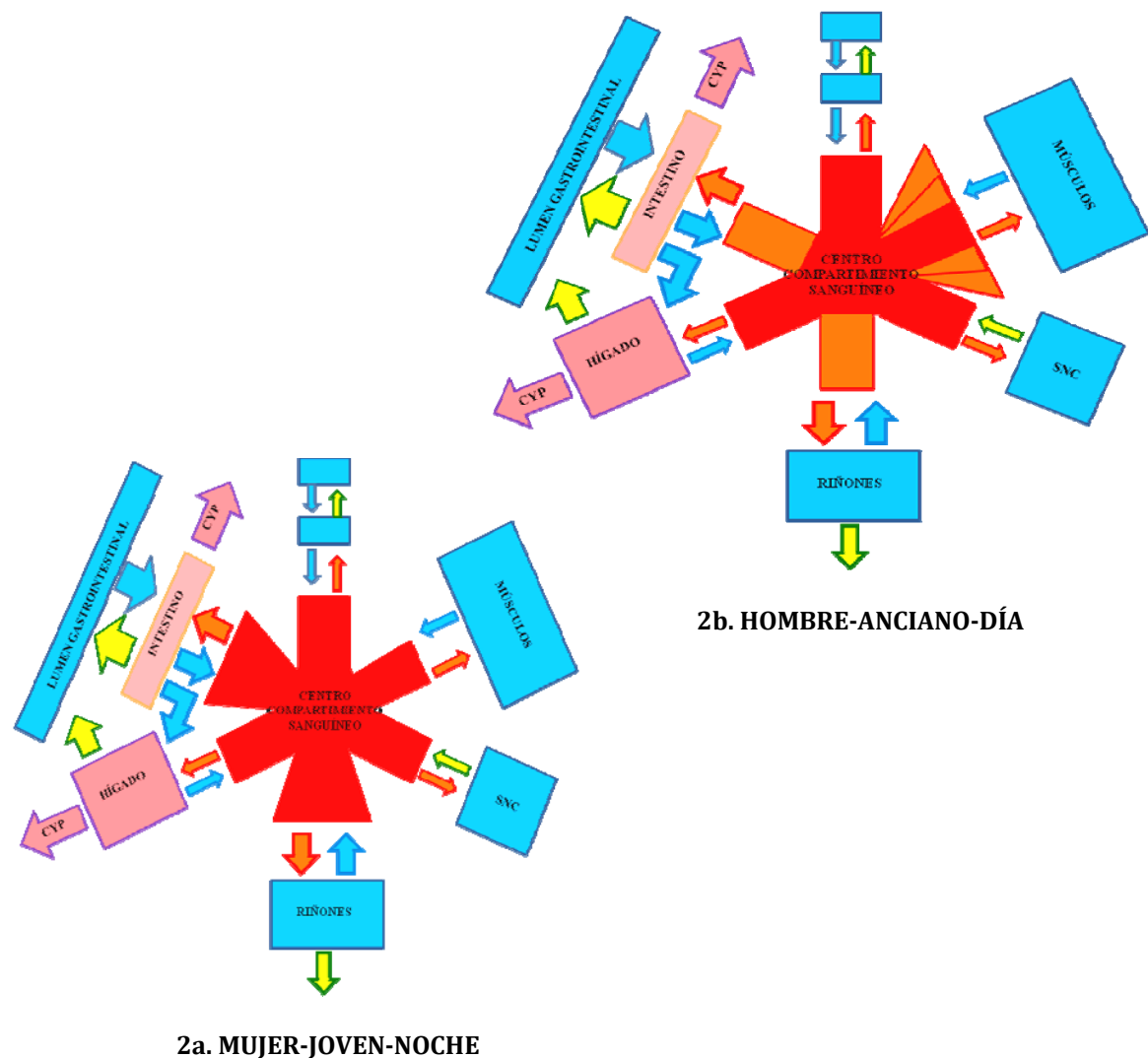


Figura 2. Diferencias farmacocinéticas en base a fisiología cardiovascular.

Sin embargo, la consideración de la diferente expresión de enzimas y transportadores y la distinta biodisponibilidad, complementarían los aspectos cruciales para realizar un adecuado pronóstico de los niveles de fármaco en el organismo. A todo ello, especialmente en la alternancia día-noche, la semivida de eliminación será clave para poder observar el inmediato impacto de la variación circadiana sobre las concentraciones de drogas

REFERENCIAS

1. Anderson GD. Sex and racial differences in pharmacological response: where is the evidence? Pharmacogenetics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *J Women's Health*, 2005; 14:19-29.
2. Ando H, Yanagihara H, Sugimoto K, et al. Daily rhythms of P-glycoprotein expression in mice. *Chronobiol Int*, 2005; 22:655-65.
3. Baron TH, Ramírez B, Richter JE. Gastrointestinal motility disorders during pregnancy. *Ann Intern Med*, 1993; 118: 366-375.
4. Bartels AL, Kortekaas R, Bart J, et al. Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: a possible role in progressive neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, 2008; 30:1818-1824.
5. Beierle I, Meibohm B, Derendorf H. Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1999; 37: 529-47.
6. Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, et al. Anticonvulsant therapy in aged patients. Clinical pharmacokinetic considerations. *Drugs and Aging*, 1997; 10:278-89.
7. Brenner SS, Klotz U. P-glycoprotein function in the elderly. *Eur J Clin Pharmacol*, 2004; 60:97-102.
8. Caponi G. Claude Bernard y los límites de la fisiología experimental. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 2001; 8: 375-406.
9. Cheitlin MD. Cardiovascular physiology: changes with aging. *Am J Geriatr Cardiol*, 2003; 12:9-13.
10. Fagiolino P. The influence of cardiac output distribution on the tissue/plasma drug concentration ratio. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2002; 27:79-81.
11. Fagiolino P, Eiraldi R, Vázquez M. The influence of cardiovascular physiology on dose/pharmacokinetic and pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships. *Clin Pharmacokinet*, 2006; 45:433-448.
12. Fagiolino P, González N, Vázquez M, et al. Itraconazole bioequivalence revisited: influence of gender on highly variable drugs. *The Open Drug Metabolism Journal*, 2007; 1: 7-13.
13. Galimberti CA, Mazzucchelli I, Arbasino C, et al. Increased apparent oral clearance of valproic acid during intake of combined contraceptive steroids in women with epilepsy. *Epilepsia*, 2006; 47: 1562-72.
14. Gibbs MA, Hosea NA. Factors affecting the clinical development of cytochrome P450 3A substrates. *Clin Pharmacokinet*, 2003; 42:969-84.
15. Greenblatt DJ, Harmatz JS, Shader RI. Clinical pharmacokinetics of anxiolytics and hypnotics in the elderly: therapeutic consideration (part II). *Clin Pharmacokinet*, 1991; 21:262-73.
16. Hämmerlein A, Derendorf H, Lowenthal DT. Pharmacokinetic and pharmacodynamic changes in the elderly: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 1998; 35:49-64.
17. Hanratty CG, McGlinchey P, Johnston GD, et al. Differential pharmacokinetics of digoxin in elderly patients. *Drugs Aging*, 2000; 17:353-62.
18. Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, et al. Chronotherapy of hypertension: administration-time-dependent effects of treatment on the circadian pattern of blood pressure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007; 59: 923-939.
19. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM, et al. Hepatic cytochrome P-4503A (CYP3A4) activity in the elderly. *Mech Ageing Dev*, 1992; 64: 189-199.
20. Ibarra M, Fagiolino A, Vázquez M, et al. Influence of gender on antiepileptic drugs pharmacokinetics: valproic acid. (enviado para su publicación, 2010).
21. Jogestrand T, Sundqvist K. Effect of physical exercise on the digoxin concentrations in skeletal muscle and serum in man. *Clin Physiol*, 1981; 1:99-104.

22. Kaminsky LS, Zhang QY. The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug Metab Dispos*, 2003; 31: 1520-5.
23. Kashuba AD, Nafziger AN. Physiological changes during the menstrual cycle and their effects on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Clin Pharmacokinet*, 1998; 38: 203-18.
24. Keogh JP, Kunta JR. Development, validation and utility of an in vitro technique for assessment of potential clinical drug-drug-interactions involving P-glycoprotein. *Eur J Pharm Sci*, 2006; 27:543-554.
25. Kivisto KT, Niemi M, Fromm MF. Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein. *Fundamental Clin Pharmacol*, 2004; 18: 621-6.
26. Le Couter DG, McLean AJ. The aging liver: drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis. *Clin Pharmacokinet*, 1998; 34:359-73.
27. Lemmer B, Scheidel B, Behne S. Chronopharmacokinetics and chronopharmacodynamics of cardiovascular active drugs: propranolol, organic nitrates, nifedipine. *Ann N Y Acad Sci*, 1991; 618:166-81.
28. Lemmer B, Scheidel B, Blume H, et al. Clinical chronopharmacology of oral sustained-release isosorbide-5-mononitrate in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*, 1991; 40:71-5.
29. Maldonado C, Vázquez M, Fagiolino P. Profundización sobre el rol de los transportadores de membrana en la terapéutica farmacológica. Tesis doctoral, 2010.
30. Masuyama H, Hiramatsu Y, Kodama J, et al. Expression and potential roles of pregnane X receptor in endometrial cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88: 4446-4454.
31. McElnay JC, D'Arcy PF. Age and genetic factors in drug interactions. In: D'Arcy PF, McElnay JC, Welling PG, editors. *Handbook of experimental pharmacology: mechanisms of drug interactions*. Berlin:Springer-Verlag, 1996; 122:279-304.
32. Meibohm B, Beierle I, Derendorf H. How important are gender differences in pharmacokinetics? *Clin Pharmacokinet*, 2002; 41:329-42.
33. Miura T, Kojima R, Sugiura Y, et al. Effect of aging on the incidence of digoxin toxicity. *Ann Pharmacother*, 2000; 34:427-32.
34. Ohdo S. Chronopharmacology focused on biological clock. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2007; 22: 3-14.
35. Ohdo S. Chronopharmaceutics: pharmaceuticals focused on biological rhythm. *Biol Pharma Bull* 2010; 33: 159-167.
36. Olano I, Vázquez M, Fagiolino P. Chronopharmacokinetics of carbamazepine and its metabolite 10,11-epoxide. *J Pharm Clin*, 1998; 17:153-6.
37. Rost D, Kopplow K, Gehrke S, et al. Gender-specific expression of liver organic anion transporters I rat. *Eur J Clin Invest*, 2005; 35: 635-43.
38. Schmucker DL. Liver function and phase I drug metabolism in the elderly. *Drugs Aging*, 2001; 18: 837-851.
39. Sowinsky K, Forrest A, Wilton J, et al. Effect of aging on atenolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Clin Pharmacol*, 1995; 35: 807-14.
40. St-Pierre MV, Spino M, Isles AF et al. Temporal variations in the disposition of theophylline and its metabolites. *Clin Pharmacol Ther*, 1985 ; 38 : 89-95.
41. Suzuki T, Zhao YL, Nadai M, et al. Gender-related differences in expression and function of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp2) in rats. *Life Sci*, 2006; 79:455-61.
42. Tanaka E. Gender-related differences in pharmacokinetics and their clinical significance. *J Clin Pharm Ther*, 1999; 24: 339-46.
43. Tang - Liu DDS, William RL, Riegelman S. Nonlinear theophylline elimination. *Clin Pharmacol Ther*, 1982; 31: 358-69.
44. Tierney S, Nakeeb A, Wong O et al. Progesterone alters biliary flow dynamics. *Ann Surg*, 1999; 229:205-209.
45. Tumer N, Scarpace PJ, Lowenthal DT. Geriatric pharmacology: basic and clinical considerations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1992; 32:271-302.
46. Turnheim K. Drug dosage in the elderly. Is it rational? *Drugs & Aging*, 1998; 13: 357-379.
47. Turnheim K. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Exp Gerontol*, 2003; 38:843-853.
48. Vázquez M, Fagiolino P, Boronat A, et al. Therapeutic drug monitoring of vancomycin in severe sepsis and septic shock. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2008; 46: 140-145.

49. Von Richter O, Burk O, Fromm MF, et al. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther* , 2004; 75:172-83.

UTILIZACIÓN RACIONAL DE LOS MEDICAMENTOS. GENÉRICOS Y BIOSIMILARES. ERRORES EN LA MEDICACIÓN

Camarasa J, Escubedo E, Pubill D.

Unidad de Farmacología y Farmacognosia, Facultad de Farmacia, Instituto de Biomedicina,
Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

USO RACIONAL DE LOS MEDICAMENTOS

La farmacoterapia, constituye, en el siglo XXI, la fracción más importante de cuantas se integran en la terapéutica. Sin embargo, y a pesar de ello, los problemas generados en la utilización de los medicamentos no paran de aumentar y, tanto a nivel del profesional sanitario como de los propios pacientes, cabe instituir un conjunto de medidas que hagan cada vez más segura y eficaz la terapéutica con medicamentos [14].

De hecho la preocupación por un mejor uso de los medicamentos quedó de manifiesto a nivel mundial cuando la Organización Mundial de la Salud en su reunión de expertos, realizada en Nairobi en 1985, definió el término “Uso Racional de los Medicamentos”, como el conjunto de medidas que los estados miembros deben llevar a cabo a fin de asegurar que cada enfermo reciba la medicación más indicada a su situación clínica, durante el tiempo que sea necesario y de forma que ello suponga el menor coste posible, tanto para el propio enfermo como para el resto de la comunidad [19]. En principio, la OMS se encarga fundamentalmente de vigilar, que exista una adecuada disponibilidad de medicamentos eficaces, de calidad y con un grado de seguridad contrastado en los países en desarrollo. En los países industrializados, la principal línea de actuación de la OMS consiste en asegurar que los profesionales sanitarios hagan una selección correcta de los medicamentos

existentes, a la vez que vigila estrechamente el flujo de información, muchas veces exhaustivo acerca de los medicamentos.

Los próximos años dibujan un panorama con un sensible aumento de la población, un marcado envejecimiento de la misma y, por tanto, con mayores necesidades sanitarias derivadas de este fenómeno, así como de la aparición de numerosas patologías. Estas necesidades tienen que garantizarse en un marco riguroso en cuanto a las exigencias de seguridad y eficacia de los medicamentos en beneficio de la calidad asistencial para los enfermos [11].

Así pues el objetivo central del “uso racional de los medicamentos” es que todos los ciudadanos sigan teniendo acceso al medicamento que necesiten, cuando y donde lo necesiten, en condiciones de efectividad y seguridad [10].

Aunque los medicamentos han contribuido decisivamente a la mejora de la esperanza y al aumento de la calidad de vida, en ocasiones plantean problemas de efectividad y de seguridad que han de ser conocidos por los profesionales. En ningún caso, debe llevarse a cabo una automedicación irresponsable ya que puede ser perjudicial para la salud si se refiere a medicamentos que deban dispensarse con receta médica. A modo de ejemplo, la utilización indiscriminada de antibióticos a través de la automedicación para patologías de origen vírico, como gripe o resfriados, ha traído como consecuencia, el que los antibióticos puedan dejar de ejercer su efecto cuando sean necesarios.

En España, la legislación actual acerca de los productos medicamentosos, ha incorporado precisamente el título de “uso racional de los medicamentos”. Así la Ley 29/2006, del 26 de julio, de “garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios”, destina una gran parte de su articulado a intensificar el uso racional de los medicamentos, a marcar estrategias orientadas a ofrecer una información de calidad, periódica e independiente a los profesionales, lo que garantiza una formación sobre uso racional de los medicamentos a los profesionales sanitarios, y también al refuerzo de la exigencia de la receta médica como documento imprescindible para la seguridad del paciente. En la misma ley, se establecen los requisitos que deben cumplir los prospectos de los medicamentos para hacerlos inteligibles a los ciudadanos. Ello se interpreta como una ayuda a la

consecución de la necesaria adherencia al tratamiento para que pueda alcanzarse el éxito terapéutico previsto [20].

En el terreno del uso racional de los medicamentos, la farmacovigilancia desempeña un papel esencial para la protección de la salud pública, ya que se encarga de prevenir, detectar y valorar los efectos adversos de los medicamentos, así como de tomar las medidas necesarias para mantener favorable su relación beneficio-riesgo. Muy recientemente, el 24 de junio de 2010, se ha confirmado el acuerdo en primera lectura entre el Consejo de la Unión Europea y el Parlamento Europeo del texto de la directiva y el reglamento europeo que regularán los procedimientos de farmacovigilancia en la Unión Europea. Esta normativa, tiene como objetivo fundamental reforzar la vigilancia, transparencia y comunicación de la seguridad de los medicamentos una vez comercializados.

Con la nueva directiva y el nuevo reglamento, se actualizará la normativa vigente en materia de medicamentos (Directiva 2001/83/CE y Reglamento 726/2004) para reforzar las tareas de farmacovigilancia, mejorar los actuales procedimientos y coordinar las actuaciones entre los distintos Estados Miembros.

De este modo, los propósitos acordados pretenden:

1. Reforzar el sistema de farmacovigilancia, estableciendo claramente las responsabilidades de las autoridades competentes y de las compañías farmacéuticas, reduciendo la carga administrativa.
2. Establecer sistemas que permitan mejorar el conocimiento sobre la seguridad de los medicamentos.
3. Involucrar a pacientes y profesionales en la notificación de las sospechas de reacciones adversas.
4. Mejorar la transparencia con la publicación de las decisiones sobre la seguridad de los medicamentos y los informes en las que se basan.

Fruto de la Presidencia española de turno dentro de la Unión Europea durante el primer semestre de 2010, se ha creado, dentro de la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) el nuevo Comité Europeo de Farmacovigilancia, en el que participará cada una de las Agencias nacionales de medicamentos de los Estados Miembros y será otro de los comités científicos de la EMA. La EMA y sus comités científicos constituyen la estructura de coordinación de todas las Agencias nacionales europeas

con el fin de que puedan emitirse opiniones comunes de ámbito europeo a partir de las evaluaciones científicas que realizan las Agencias nacionales. Este comité se encargará en concreto de evaluar y emitir recomendaciones sobre los problemas de seguridad que puedan aparecer con los medicamentos comercializados en la Unión Europea, así como de revisar los protocolos de los estudios de seguridad post-autorización que las Agencias requieran a las compañías farmacéuticas. Asimismo, se ocupará de evaluar los resultados de dichos estudios.

También se ha alcanzado acuerdo sobre la evaluación periódica de todos los nuevos datos que sobre la seguridad del medicamento vayan apareciendo. En este sentido, se establece un procedimiento que permite optimizar los recursos de las agencias de medicamentos, mediante una evaluación única y simultánea para todos los medicamentos autorizados en Europa que contengan los mismos principios activos. Pero, en el marco de la Unión Europea y tomando España como Estado miembro representativo, ¿cuáles son los principales problemas en cuanto a la utilización de los medicamentos? Podríamos considerar los siguientes:

1. Utilización de fármacos de dudosa o nula utilidad terapéutica.
2. Prescripción excesiva de fármacos en procesos autolimitantes o de baja gravedad para los que no estarían indicados.
3. Prescripción insuficiente de fármacos con clara utilidad terapéutica.
4. Prescripción insuficiente de fármacos de eficacia demostrada pero bajo coste en contraposición de los más novedosos, con menor experiencia, con pocas ventajas terapéuticas (mayoritariamente fármacos copia o “*me too*”) pero alto coste.
5. Prescripción de fármacos en indicaciones no autorizadas.
6. Prescripción selectiva de los fármacos de mayor coste frente a los de menor en un gran conjunto de patologías.

Así pues, teniendo en cuenta que los principales problemas se refieren a una prescripción inadecuada, las autoridades sanitarias han propuesto un conjunto de medidas a fin de paliar dichos déficits. Entre ellas podemos citar las siguientes:

1. Proporcionar al médico prescriptor una información rigurosa y contrastada sobre las novedades farmacológicas.
2. Fomentar la investigación farmacológica y su traslación a la clínica.

3. Adoptar estrategias terapéuticas basadas en la mejor relación beneficio/riesgo y de acuerdo con las evidencias científicas disponibles.
4. Formar a los profesionales en temas específicos de selección de medicamentos, ensayos clínicos e interpretación de los mismos.
5. Potenciar todo aquello que hace referencia la farmacovigilancia, creando el clima social necesario para una participación activa de todos los profesionales implicados.

De todo ello se desprende que el objetivo prioritario es el de conseguir que el profesional sanitario disponga de una información y una formación con respecto al medicamento de calidad y que pueda, en consecuencia, realizar una prescripción lo más adecuada posible. Es preciso considerar “el problema del uso racional de los medicamentos como un problema de salud” frente al que hay que adoptar medidas que deben ser evaluadas en términos de indicadores de salud. El médico prescriptor debe ser considerado como el protagonista de estas medidas y no como un destinatario de las mismas.

El beneficio que supone tanto para el enfermo como para el médico, ha sido del todo demostrado ya que una prescripción racional y de mayor calidad es del todo más eficiente y segura.

USO COMPASIVO DE LOS MEDICAMENTOS

El uso compasivo de los medicamentos consiste en la utilización en determinados pacientes, al margen de un ensayo clínico, de productos en fase de investigación clínica o de medicamentos autorizados con otra(s) indicación y que el médico, bajo su entera responsabilidad, considera necesaria su utilización.

De hecho, este uso debe fundamentarse en principios éticos y en indicios de efectividad tan sólidos como los que se requieren para un ensayo clínico. La ausencia de “otra alternativa mejor” no debe justificar en absoluto la práctica clínica de terapéuticas no debidamente contrastadas. Normalmente, la selección viene dada por darse una situación extrema o debida a que otros tratamientos no hayan funcionado con anterioridad.

Quizás el término “compasivo” (que no es más que una traducción literal del término inglés “*compassionate*”) no refleja adecuadamente el sentido de lo antes referido, ya

que puede fácilmente confundirse con el de tratamiento altruista, paliativo, o incluso mucho peor, de placebo.

El uso compasivo de medicamentos no tiene un estatus uniforme en toda la Unión Europea. A título de ejemplo, España permite el uso compasivo pero no así Francia. Es la propia Ley de 2006 citada al inicio de este capítulo la que recoge las disposiciones legales que permiten en España la aplicación de medicamentos no autorizados a pacientes no incluidos en un ensayo clínico con el fin de atender como “uso compasivo” necesidades especiales de tratamiento de situaciones clínicas especiales y en pacientes concretos.

El “uso compasivo” de medicamentos lo puede solicitar un médico especialista del ámbito hospitalario. Lo hará a través del servicio de Farmacia del hospital y podrá ser administrado a pacientes en régimen interno o ambulatorio.

Siempre debe considerarse como “excepcional” el “uso compasivo” de medicamentos. En el caso de que existan indicios suficientes o algún resultado preliminar que sugiera la eficacia de un medicamento en una patología determinada, lo normal debería ser el inicio de un ensayo clínico destinado a demostrar de forma concluyente dicha utilidad. Debe hacerse hincapié de que la metodología del ensayo clínico es la única que permite obtener resultados de forma concluyente y validada universalmente. El uso compasivo debería limitarse a aquellos pacientes que, estimándose que puedan obtener un beneficio clínico objetivo, no cumplen con los criterios de inclusión en el correspondiente ensayo clínico. A pesar de ello, el número de tratamientos compasivos ha aumentado notablemente en los últimos años.

EL CUMPLIMIENTO TERAPÉUTICO

Para que el uso del medicamento sea adecuado y “racional” el paciente debe recibirlo en la forma “correcta”. Para ello no basta con una correcta prescripción, sino que hay que tener en cuenta el grado de cumplimiento por parte del propio paciente [7].

Últimamente se prefiere el término “adherencia” al de cumplimiento ya que supone un papel más activo por parte del enfermo. Sea cual sea el término empleado, el concepto se refiere al grado en que la conducta de un enfermo, en relación a la toma

de la medicación, el seguimiento de una dieta o la modificación de hábitos de vida, coincide con lo prescrito por el médico. En la práctica clínica se refiere sobre todo a la pauta de medicación prescrita por el médico.

En general, la adherencia es mejor en aquellos tratamientos sintomáticos que en los etiológicos, ya que en estos últimos no suelen apreciarse beneficios clínicos de forma inmediata. Asimismo es muy frecuente comprobar que pacientes crónicos (por ej. hipertensos, epilépticos, etc.) se controlan adecuadamente durante las fases de ingreso hospitalario, mientras que no consiguen dicho control en las fases de tratamiento ambulatorio.

El grado de adherencia es bajo. En ello influyen una gran cantidad de variables o factores. Desde factores sociodemográficos, como la edad o psicológicos y del entorno como pacientes que viven solos y con manifiesta hostilidad a tratamientos médicos, hasta factores más propiamente farmacoterapéuticos como pueden ser las características propias del tratamiento (vía de administración y pautas complejas, cambios en el tratamiento) o los derivados de la propia enfermedad (número de patologías concomitantes, enfermedades psiquiátricas, etc.)[9]. No cabe desdeñar otros factores como el almacenamiento de medicamentos no consumidos que, sin duda, dificultan el grado de cumplimiento del régimen terapéutico propuesto.

MEDICAMENTOS GENÉRICOS Y BIOSIMILARES

Medicamentos genéricos

Un medicamento genérico es aquella especialidad farmacéutica que tiene el mismo principio activo, la misma dosis, la misma forma farmacéutica y las mismas características cinéticas, dinámicas y técnicas que un medicamento que no está protegido por patente y que se usa como referencia legal técnica.

La principal característica desde el punto de vista farmacoterapéutico es que el medicamento genérico debe demostrar la bioequivalencia terapéutica con el medicamento original que le sirve de referencia [6].

La razón de la aparición en el mercado de los denominados “genéricos”, refiriéndose a medicamentos es que una vez ha expirado la patente del medicamento original o de referencia, la compañía farmacéutica ha perdido la exclusividad acerca de la susodicha especialidad [13].

Inicialmente, la principal ventaja de los genéricos fue el de su menor precio que sus correspondientes medicamentos de referencia. Ello motivó el interés de las autoridades sanitarias, preocupadas por reducir el gasto/consumo farmacéutico. De esta forma la mayor parte de los gobiernos en el marco de la UE han incentivado las políticas farmacéuticas en el sentido de favorecer la prescripción de medicamentos genéricos. Ahora bien, las políticas de las compañías farmacéuticas han rebajado considerablemente los precios de los productos de referencia, con lo que el incentivo económico ha dejado de ser prioritario en muchos países. Si bien varía en cada país la legislación de medicamentos genéricos, en España la identificación de este tipo de medicamentos viene por la presencia en el envase de la Denominación Oficial Española (DOE) o, en su defecto, por la Denominación Común Internacional (DCI), seguida del nombre o marca del titular o fabricante y las siglas EFG (Especialidad Farmacéutica Genérica), lo que garantiza que el producto en cuestión, cumple con las condiciones de efectividad y seguridad requeridas por la legislación vigente. Hay que prestar mucha atención en la prescripción de medicamentos genéricos de los que existen distintas formas/posologías de presentación. La bioequivalencia que debe cumplir toda EFG se basa en la inicial igualdad de cantidad de producto. Es por ello que debe prestarse especial atención en este apartado de la prescripción de genéricos [8].

En México, los genéricos han incorporado el término “intercambiable” para aquellos productos que cumplen todos los requisitos de bioequivalencia antes comentados y que se consumen dentro del Sector Salud (entiéndase la Secretaría de Salud y los institutos Mexicano del Seguro Social, IMSS, y de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, ISSSTE). Este término refuerza el sentido de equivalencia de los distintos productos genéricos con respecto a los de referencia.

Biosimilares

Si bien la tendencia es la de definir a los biosimilares como los genéricos de los medicamentos biológicos, ello no es correcto. Así pues “biosimilar” no es igual a “biogénico” [5].

Biosimilar se corresponde a una definición dada por la EMA y consistente en “la copia aprobada de un medicamento de origen biotecnológico producida de acuerdo

a exigencias específicas respecto a calidad, eficacia y seguridad”. Un biosimilar es un semejante, no un igual.

Medicamentos de origen biológico, es decir obtenidos partir de un organismo vivo, los ha habido desde hace mucho tiempo (inmunoglobulinas, heparinas, factores de la coagulación, entre otros). Lo novedoso con respecto a los biosimilares son las técnicas de producción. En efecto, en la década de los 80 se acuñó el término de medicamento biotecnológico para designar aquellos productos obtenidos por técnicas biotecnológicas, es decir utilizando organismos vivos pero “manipulados”. De ello se deduce que todos los medicamentos de origen biotecnológico son biológicos pero no a la inversa.

A pesar que los medicamentos biotecnológicos pueden ser de estructura diversa, el grueso hoy en día lo constituyen las proteínas o péptidos. Lo que conocemos hoy en día bajo la denominación común de “proteínas terapéuticas”. La herramienta biotecnológica más importante en el desarrollo de estos productos ha sido la técnica del DNA recombinante. Un ejemplo de ello lo tenemos en la hormona de crecimiento. La introducción en el mercado de la somatotropina de origen recombinante eliminó la, hasta entonces procedente de las hipófisis de cadáveres humanos, al mismo tiempo que limitaba la aparición de la enfermedad de Creutzfeld-Jacob. La técnica del DNA recombinante consiste básicamente en la inserción (normalmente gracias a un vector viral) de un gen codificante de una proteína determinada en el genoma de una célula procariota (bacteria) o eucariota (levadura o mamífero). A la población con el gen insertado se la conoce como sistema de expresión. El gen humano insertado se “recombina” con el genoma de la bacteria y ésta produce la proteína humana como si fuera propia. Lo destacable del proceso es que la población bacteriana es capaz de producir la proteína en cantidades importantes, a una gran velocidad y como si se tratara de una copia más o menos exacta de la proteína humana.

En los medicamentos biotecnológicos “el producto es el proceso”. Ello es así porque pequeñas variaciones en el proceso de producción pueden conducir a cambios estructurales que pueden tener consecuencias importantes en cuanto a la variación de la actividad farmacológica.

El escoger como sistema de expresión una población bacteriana se debe al hecho de que la producción proteica es muy rápida. Se asume que a partir de una sola bacteria que se divide cada 20 minutos se formarán más de un billón de células procariotas en unas 15 horas. Ello es del todo ventajoso con respecto a la utilización de células eucariotas más complejas, como la de mamífero, procedentes del ovario del hámster chino (células CHO) en las que la tasa de producción es notablemente más lenta. Pero no sólo es un tema de velocidad de producción. Las bacterias no son capaces de glucosilar determinadas proteínas, mientras que las células de mamífero sí lo son. La glucosilación es fundamental en el reconocimiento de la actividad de ciertas proteínas, lo que influirá decisivamente en la viabilidad terapéutica posterior del medicamento y, sobre todo y más importante, en cuestiones acerca de su seguridad. Ello implica que el perfil de seguridad y sus análisis, requerido para un medicamento biotecnológico ha de ser superior al de los procedimientos requeridos para los fármacos “clásicos” [18].

Las proteínas, moléculas de gran tamaño, presentan una elevada probabilidad de expresar regiones en su estructura que se comporten como determinantes antigénicos. ¿Por qué proteínas recombinantes con una secuencia aminoacídica idéntica a la de la proteína humana presentan un riesgo de inmunogenicidad? La respuesta puede atender a distintos criterios. Las proteínas recombinantes (al igual que las naturales) son estructuras tridimensionales complejas cuyo plegamiento genera una forma muchas veces inestable. Es esta inestabilidad la que puede generar una alteración en la posición de determinadas regiones dentro de la molécula que actúen como epítopes. Otras veces (caso por ejemplo de algunos interferones), las proteínas recombinantes tienden a agregarse lo cual favorece la actuación como un desencadenante antigénico. Finalmente, el propio proceso de producción puede ser el responsable de la inmunogenicidad. En el proceso de la purificación de la proteína pueden permanecer restos de impurezas, como por ejemplo restos del genoma de la bacteria que ha incorporado el gen humano que si serían los responsables directos del proceso inmunitario [5].

La complejidad de las técnicas biotecnológicas empleadas en la obtención y producción de proteínas recombinantes, unido a los lógicos compromisos de

confidencialidad de las compañías farmacéuticas, hacen prácticamente imposible la generación de una copia idéntica.

Ya que no es posible, pues la obtención de esa copia idéntica, los criterios de desarrollo de un biosimilar han de ser mucho más estrictos que los de fabricación de un genérico al que, tal como hemos visto, tan sólo debe exigírsele el criterio de bioequivalencia.

ERRORES EN LA MEDICACIÓN

Un error de medicación es cualquier acontecimiento evitable que tiene lugar durante la prescripción, preparación, dispensación o administración de un medicamento, independientemente de si se produce una lesión o la posibilidad de que ésta aparezca. Se diferencia de la reacción adversa en que ésta, la mayor parte de las veces no se puede prevenir, lo que sí se puede hacer en el caso del error de medicación [12].

De acuerdo con la *American Society of Hospital Pharmacists* [1], los diferentes tipos de errores de medicación son:

- Omisión de una o varias tomas.
- Errores en la prescripción.
- Administración de un medicamento erróneo.
- Errores en la dosis administrada.
- Forma farmacéutica errónea.
- Administración errónea del medicamento.
- Falta de monitorización.
- Falta de adherencia a la pauta terapéutica.

Los errores que se producen en la cadena del medicamento son potencialmente lesivos para los pacientes y, por tanto, han de prevenirse y evitarse. Por este motivo, prevenir y evitar errores de medicación no es únicamente una obligación del médico prescriptor, sino que debe ser el resultado del esfuerzo conjunto de los profesionales de la salud implicados en la atención a los pacientes. Al mismo tiempo, las instituciones sanitarias deben proporcionar las herramientas necesarias para facilitar dicha prevención [15].

La incidencia y la causa de los errores de medicación se han estudiado más exhaustivamente en el ámbito hospitalario. Una revisión reciente revela que los errores de medicación afectan entre el 1 y el 2% de los pacientes ingresados y que los errores de prescripción constituyen el tipo de error de medicación más frecuente en este entorno [16].

El desarrollo de estrategias como la prescripción informatizada, las hojas de prescripción preimpresas y la implicación del farmacéutico han contribuido de manera significativa a disminuir los errores de prescripción por similitud fonética u ortográfica, legibilidad, presentación, duplicidad, incompatibilidad, interacción o contraindicación. Sin embargo, la implementación de las medidas mencionadas no es suficiente y es importante saber cuáles son los errores de prescripción más frecuentes y cómo prevenirlos [4].

Los errores de prescripción se pueden agrupar en las siguientes categorías [2]:

- Ausencia de indicación para el medicamento prescrito.
- Medicamento contraindicado.
- Medicamento que interfiere con alergias conocidas.
- Medicamento con indicación aprobada, pero prescrito en dosis inadecuadas.
- La frecuencia de dosificación no se corresponde con el perfil farmacocinético del medicamento o con la función renal y hepática de los pacientes.
- La prescripción médica es verbal.
- La prescripción médica es ilegible.
- La prescripción médica es incompleta en cuanto al nombre del medicamento, la dosis, la frecuencia, la vía de administración, la indicación para un uso frecuente y la duración, en su caso.
- La dosis se modifica sin que se haya suspendido la prescripción médica previa.
- Uso de abreviaturas no aprobadas.
- No se indica la duración del tratamiento.
- No se ha registrado la posible alergia a los medicamentos.

El primer programa de notificación de errores de medicación a nivel nacional se inició en USA [17]. Fue el programa MERP que desde 1991 opera junto con la *United States Pharmacopeia* (USP). En USA, la FDA mantiene también un programa estatal, el *Medwatch* que, aunque es un programa de farmacovigilancia, recoge también desde hace unos años información sobre algunos tipos de errores en la medicación, la cual es compartida con el programa MERP. Otros países que disponen de programas nacionales son: Australia, que también opera en Nueva Zelanda y Canadá (programa AIMS). En Gran Bretaña, la *National Patient Safety Agency* también tiene un programa de notificación de errores en la medicación.

España mantiene desde su creación en 1999 un programa nacional, adherido al programa internacional MERP, que recoge las comunicaciones y experiencias de los profesionales sanitarios y permite la evaluación conjunta de la información sobre errores en la medicación [15]. Su objetivo básico es centralizar y obtener información sobre los errores y sus causas, con el fin de establecer y transmitir recomendaciones prácticas dirigidas a evitar que los errores notificados vuelvan a producirse. Este programa de notificación de errores de medicación es similar al programa MERP y presenta tres características fundamentales: es voluntario, confidencial e independiente. Es decir, recoge las comunicaciones y experiencias sobre errores en la medicación, potenciales o reales, que los profesionales sanitarios deseen notificar de forma voluntaria, garantiza en todo momento el tratamiento confidencial de la información y realiza un análisis independiente de la misma para poder determinar objetivamente las causas de los errores, sin ningún tipo de conflicto de intereses [3].

Todas las notificaciones recibidas se analizan desde la perspectiva de sistema y se registran. Según sus características, se remiten a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. En el caso particular de que se trate de errores relacionados con el nombre de los medicamentos, etiquetado o envasado se envía un informe a las compañías farmacéuticas responsables. Finalmente, las notificaciones recibidas que pueden ser de interés general, junto con recomendaciones específicas, así como otro tipo de información, novedades, etc., se divulgan a través de la página web del Instituto para el uso seguro de los

medicamentos de España (<http://www.ismp-espana.org/>) y otros medios de difusión.

REFERENCIAS

1. American Society of Hospital Pharmacy. ASHP guidelines on preventing medication errors in hospitals. *Am J Hosp Pharm.* 1993; 50: 306-314.
2. Beers MH, Ouslander JG, Rollinger I, et al. Explicit criteria for determining inappropriate medication use in nursing home residents. UCLA Division of Geriatric Medicine. *Arch Intern Med* 1991; 151: 1825-1832.
3. Boletín de prevención de errores en la medicación en Cataluña. Insulina i errors de medicació. Disponible en: <http://www.gencat.cat/salut/depsalut/pdf/preven205.pdf> (consultada: 15 de julio de 2010).
4. Committee on Drugs and Committee on Hospital Care. Prevention of Medication Errors in the Pediatric Inpatient Setting. *Pediatrics* 2003; 112: 431-436.
5. De Mora, F. Biomedicamentos: ya, una nueva era. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica* 2009; 7: 14-23.
6. European Medicines Agency (EMA). Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. London 2001.
7. Fick DM, Cooper JW, Wade WE, et al. Updating the Beers criteria for potentially inappropriate medication use in older adults: results of a US consensus panel of experts. *Arch Intern Med* 2003; 163: 2716-2724.
8. Food and Drug Administration. Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products. General considerations. Rockville. 2003.
9. Gallagher P, Ryan C, Byrne S, Kennedy J, O'Mahony D. STOPP (Screening tool of older person's prescriptions) and START (Screening tool to alert doctors to right treatment). Consensus validation. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2008;46:72-83.
10. García, F. Uso racional de los medicamentos. *Med Clin* 1990; 94: 628-632.
11. Institute for Safe Medication Practices list of confused drug names. Disponible en: <http://www.ismp.org/Tools/confuseddrugnames.pdf> (consultada: 15 de julio de 2010).
12. Lacasa C. Accidentes con medicamentos. Conceptos, clasificación y métodos de detección. En: Lacasa C, Humet C, Cot R, editores. Errores de medicación. Prevención, diagnóstico y tratamiento. 1ª edición. Barcelona. Ed. EASO. 2001. pp 15-22.
13. Laguna-Goya, N., Blázquez, A, Pozo, C. Legislación sobre autorización de genéricos. *Farm Hosp* 2006; 30: 379-384.
14. Lorenzo, P., Moreno A., Leza, JC, Lizasoain, I, Moro, MA, Portolés, A. Velázquez. *Farmacología básica y clínica.* 18ª edición. Ed. Panamericana. Madrid. 2008. pp.1293-1304.
15. Martínez J. Errores de prescripción. A: Lacasa C, Humet C, Roser C, editores. Errores de medicación, prevención, diagnóstico y tratamiento. 1ª edición. Barcelona. Ed. EASO. 2001. pp. 197-204.
16. McLeod PJ, Allen RH, Tamblyn RM, Gayton DC. Defining inappropriate practices in prescribing for elderly people. A national consensus panel. *Can Med Assoc J* 1997; 156: 385-391.
17. Nichter MA. Medical errors affecting the pediatric intensive care patient: incidence, identification, and practical solutions. *Pediatr Clin North Am* 2008; 55: 751-757.
18. Nightingale, SL, Morrison, JC. Generic drugs and the prescribing physician. *JAMA* 1987; 258: 1200-1204.
19. Organización Mundial de la Salud. Conferencia de Expertos de Nairobi. Uso racional de los medicamentos. Ginebra. 1985.
20. Roca Cusachs A. Estrategias de intervención para mejorar El cumplimiento. *Med Clin* 2001; 116: 56-62.

26

ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS DEL TRATAMIENTO ANTIEPILÉPTICO Y SU MONITOREO MEDIANTE EL USO DE SALIVA

Fagiolino P, Vázquez M, Maldonado C.

Departamento de Farmacología y Biofarmacéutica, Facultad de Química, Universidad de la República de Uruguay, Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una enfermedad crónica que afecta a un importante sector de la población mundial. Las crisis epilépticas significan un serio problema en tanto afectan el normal desenvolvimiento social del paciente. El tratamiento farmacológico es la alternativa más empleada para recuperar al individuo, y reinsertarlo en su ambiente de estudio y de trabajo. Dado que el tratamiento se prolonga por mucho tiempo, la administración oral de medicamentos es el modo más habitual de llevar a cabo la terapia antiepiléptica. Es por ello que centraremos nuestro desarrollo en esta vía de ingreso.

Normalmente estudiamos las respuestas farmacológicas que se obtienen tras la administración del medicamento en sus dos grandes aspectos: 1) aquellos relacionados con las concentraciones de fármaco en el paciente (farmacocinética: PK); y 2) aquellos relacionados con los efectos producidos (farmacodinamia: PD); sin profundizar en que sólo las concentraciones en los sitios de acción son responsables en primera instancia de los efectos, y que estos pueden a su vez condicionar seriamente las mismas. Trataremos en esta resumida presentación de llegar a un apropiado entendimiento del problema, sin entrar en complejas demostraciones, pero abordando con el necesario rigor la transferencia de moléculas entre los diferentes espacios corporales, algunos de los cuales son

externos al organismo, otros alojan los sitios de acción, en tanto otros son intermediarios entre ellos.

La administración oral del fármaco lo deposita en el tracto digestivo para desde allí dirigirse, por medio de fuerzas contenidas en el propio medicamento (ingrediente activo más tecnología) y por otras que pone en juego la fisiología del individuo, hasta zonas tan distantes como el cerebro, debiendo arribar en concentraciones suficientes para desencadenar las acciones bioquímicas que beneficien al paciente. Por tratarse de sistemas abiertos, es decir con pérdida de masa en el transcurso del tiempo, las dosis deben reiterarse con apropiado ritmo a los efectos de mantener niveles en la biofase (sitios de acción terapéutica y de acción no deseada) eficaces y no tóxicos. La correcta posología debe tener en cuenta principios farmacocinéticos fundamentales que resumiremos a continuación.

CONCEPTOS BÁSICOS DE LA TRANSFERENCIA DE MASA ENTRE COMPARTIMIENTOS

Las moléculas en solución requieren de energía cinética para poder desplazarse en el interior del compartimiento en donde se encuentran alojadas, y así alcanzar los límites franqueables que permitan su transferencia a compartimientos contiguos. La capacidad de salir de un compartimiento se relaciona con la energía termodinámica contenida en la interacción soluto-solvente y con la energía cinética que acerca las moléculas de soluto a la puerta de salida. Normalmente la transferencia de fármacos entre compartimientos está regida por la ley cinética de primer orden, que relaciona de manera directa la velocidad del proceso de salida (dX/dt) con la cantidad de soluto (X) presente en el compartimiento a un tiempo (t) dado.

$$dX/dt = k \cdot X \quad \text{[ecuación 1]}$$

$$k = (dX/dt) / X = (dX/X) / dt \quad \text{[ecuación 2]}$$

A mayor cantidad de fármaco, mayor velocidad de transferencia (ec. 1). La constante de velocidad de primer orden (k) refiere, según muestra la ecuación 2, a la fracción de moléculas (dX/X) que se transfiere por unidad de tiempo (dt). En procesos de primer orden dicha fracción es siempre la misma a lo largo del tiempo, en tanto no se afecten otros factores que seguidamente veremos.

Este simple concepto no es resaltado en los textos de farmacocinética, y tan asumida está dicha constancia que habitualmente se denominan a estas constantes, o a funciones híbridas que involucran varias de ellas, como parámetros de los sistemas fármaco-individuo. Sin embargo, es bien sabido que lo constante es precisamente la variación temporal de los sistemas, ya sea de manera cíclica (ritmos circadianos y otros), o de manera no cíclica (en el transcurso de los años y envejecimiento), o de manera ocasional (actividad física, ingesta de comida, enfermedad y evolución clínica, etc.). Por cierto que muy diferentes pueden ser los sistemas cuando se consideran individuos diferentes, debido a su genotipo, sexo, etc. Por tales razones hemos considerado la necesidad de reformular los conceptos sobre los cuales debe transitar el análisis farmacocinético de los sistemas [1, 2], y bajo esta óptica encararemos la discusión del tema. Por lo pronto decir que las “constantes” k dependen de varios factores, algunos de los cuales pueden desagregarse multiplicativamente [2], en tanto que otros se mantienen agrupados en lo que llamamos “constante intrínseca”:

$$k = A \cdot (1/V) \cdot \theta \cdot k_{\text{intrínseca}} \quad [\text{ecuación 3}]$$

Distancia a la superficie de salida del compartimiento

El área de la superficie de transferencia (A) y el volumen del compartimiento (V) son dos factores esenciales que inciden de manera directa e inversamente proporcional, respectivamente, en el valor de k . Cuanto mayor sea el área y menor el volumen, más veloz será la transferencia para una dada cantidad de moléculas presente en el compartimiento. La figura 1a simboliza mediante rectángulos el volumen compartimental, la extensión del lado que contiene la superficie de salida representa el área, y el grosor de la flecha saliendo del compartimiento simboliza el valor de k . Puede fácilmente concluirse que la distancia media perpendicular a la superficie de salida determina la velocidad del proceso de transferencia. Cuanto menor sea ésta, más velozmente se transferirá masa desde el compartimiento.

Es muy importante traer a consideración un concepto básico en farmacocinética, el cual refiere al producto entre k y V , denominado *clearance* del compartimiento. Es decir, aclaramiento de soluto por parte de un compartimiento, como si fuera un color que se desvaneciera a medida que se pierde colorante del medio. Como fácilmente se deduce, la salida de moléculas medida a través del *clearance* se

independiza del volumen. Este modo de ver el proceso de salida tiene mucha relevancia cuando se analiza el equilibrio que se obtiene al reponer soluto en la misma velocidad con que se pierde del compartimiento. Una distancia corta, resultante de aumentar área sin modificar volumen, demandará una reposición más rápida si se desea mantener la masa constante, y por lo tanto una concentración constante. Si logrado un equilibrio con una determinada concentración, se redujera la distancia sin modificar el volumen, ni la velocidad de reposición, se llegaría a un nuevo equilibrio con concentración menor, es decir menor número de moléculas en el compartimiento.

El concepto de *clearance* es también muy importante para relacionar concentraciones de equilibrio con velocidades de reposición. Si la velocidad de entrega de masa a un compartimiento de *clearance* constante se modificara, la concentración de equilibrio resultante sería directamente proporcional a dicha tasa de reposición.

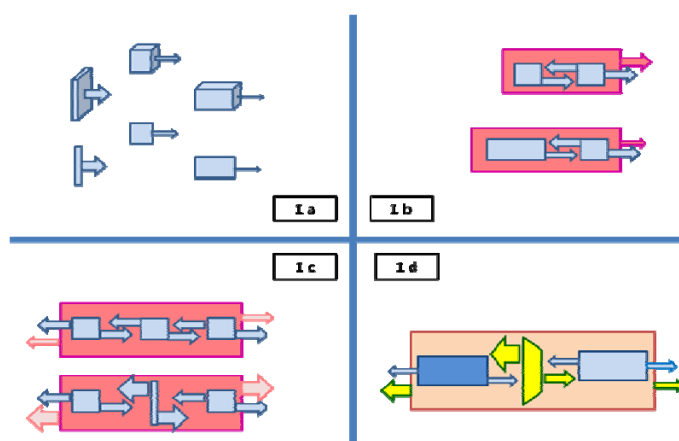


Figura 1. Representación esquemática de compartimientos simples y combinados. El grosor de las flechas refiere al valor de la constante cinética de primer orden. El tamaño del rectángulo y del lado por donde sale el soluto refiere al volumen y al área de transferencia, respectivamente.

Fracción de moléculas termodinámicamente aptas para ser transferidas

Hay que tomar conciencia que en farmacocinética los compartimientos pueden tener relación con el espacio físico real donde se ubican las moléculas de fármaco, o pueden referir a un espacio “termodinámico” no físico. Algunos ejemplos que aplican este concepto los encontramos al tratar las diferentes formas en que la molécula se encuentra presente en el mismo espacio físico: 1) libre o ligada a un componente

imposible de ser transferido (proteínas plasmáticas, tisulares, células sanguíneas, etc.); 2) ionizada o no ionizada, siendo sólo una de ellas capaz de transferirse (por ejemplo, a través de la barrera hematoencefálica, etc.). Estos casos se analizan mediante varios compartimientos interconectados al interior de un mismo espacio físico, uno de los cuales contiene la especie transferible, y por lo tanto con salida hacia el exterior, tal como se ilustra en la figura 1b.

La ecuación 3 contiene en θ un factor que podría desagregarse, y que representaría la fracción de masa (f) apta para ser transferida al exterior del espacio cuyo volumen es V . El cociente f/V sería el inverso del volumen combinado de los dos compartimientos involucrados en la figura 1b, uno de los cuales no tiene la dimensión real pero afecta la cinética del proceso de transferencia. El equilibrio que allí se muestra puede, por desplazamiento hacia la especie no transferible, agrandar el “volumen” del compartimiento combinado, y así reducir la velocidad de transferencia.

Macrocompartimientos resultantes de equilibrios o seudoequilibrios

Es habitual en farmacocinética simplificar los modelos a los efectos de hacer más sencilla la deducción de las ecuaciones que describen la evolución temporal de las concentraciones en los distintos espacios corporales. Sin embargo, la simplificación no debe hacer perder de vista que la salida desde dicho macro-compartimiento tiene aún vigente la múltiple interdependencia de factores involucrados en cada transferencia compartimental simple. Los diferentes compartimientos constitutivos se relacionan entre sí siguiendo sus respectivas cinéticas de transferencia, no obstante lo cual a partir de determinado momento las concentraciones se relacionan de manera estable y solidaria, según el denominado seudoequilibrio, que puede ser de verdadero equilibrio (sin cambio en el valor de las concentraciones) cuando se compensa la pérdida de masa del sistema con la entrega continuada de fármaco por vía exógena.

La figura 1c muestra un agrupamiento de tres compartimientos con salida por los dos ubicados a los extremos. Es interesante observar cómo el compartimiento del centro gobierna la velocidad del proceso de salida, reduciendo o agrandando su volumen por ejemplo. Dicho compartimiento puede ser tan estrecho como una membrana celular, o tan grande como el espacio intravascular del aparato

circulatorio. Ambos compartimientos de interconexión presentan la particularidad de asociar fenómenos activos de transferencia de sustancias, como veremos seguidamente.

Procesos de transferencias consumidores de energía

No siempre la salida hacia ambos costados del compartimiento intermediario, mostrado en 1c, procede con la misma intensidad cinética. Tanto la membrana citoplasmática como el aparato cardiovascular pueden distribuir solutos de manera asimétrica. En ambos casos un consumo energético podría direccionar en forma preferencial la transferencia hacia un lado, como en la membrana, o a determinados órganos, como en el aparato circulatorio. El mecanismo en ambos casos es diferente, pero la razón última de la asimétrica transferencia responde a una asimétrica aplicación de energía que mueve la masa de solutos en cierta dirección.

En la membrana, un transportador conduce al sustrato desde un lado hacia el otro de manera preferencial como resultado de aplicación de energía, la cual empuja al fármaco mediante cambios conformacionales de la proteína constituyente de la membrana. En el aparato circulatorio, la energía que continuamente gasta el corazón propulsando sangre por los vasos se acumula preferencialmente en aquellos territorios arteriales que sufren dilataciones, a expensas de otros donde operan constricciones. De este modo, la masa de solutos que circula por el torrente sanguíneo se reparte en fracciones desiguales, en términos relativos al tamaño de los órganos que irrigan, haciendo que las moléculas difundan al exterior del aparato circulatorio con mayor intensidad por los capilares favorecidos, en detrimento de otras regiones capilares menos abastecidas. La figura 1d muestra la simbología que adoptaremos cuando exista transferencia preferencial en una dirección.

No es intención profundizar aquí en este mecanismo cardiovascular de transferencia de solutos [3, 4], pero corresponde alertar que constituye la esencia del proceso por el cual el aparato circulatorio lleva nutrientes y oxígeno a cada tejido según la necesidad energética. Compartiendo este proceso, las drogas siguen una distribución ajena a los requerimientos terapéuticos, con resultados clínicos favorables en un caso y desfavorables en otro caso para cada paciente [5].

Es muy importante resaltar el hecho de que la sangre es el fluido más ampliamente utilizado para monitorear, tanto las concentraciones de sustancias endógenas como

las concentraciones de fármacos utilizados en los tratamientos. Estos procesos consumidores de energía hacen que no alcancemos equilibrios, con igualdad de concentraciones libres, aún cuando los compartimientos en consideración presenten idéntica constitución fisicoquímica. Es decir, dos espacios acuosos, como por ejemplo plasma y líquido intersticial, al mismo pH y composición química, podrían presentar en el equilibrio concentraciones de fármaco libre diferentes. Ocurre otro tanto entre el espacio extracelular e intracelular, o mismo entre los anteriormente citados, cuando se agrega la transferencia mediada por transporte activo de membrana. Estos fenómenos distorsionan fuertemente la predicción de efectos a partir de las concentraciones plasmáticas de las drogas.

Con el ánimo de mejorar nuestras predicciones a partir de concentraciones plasmáticas de fármaco, hemos propuesto desagregar de θ , en la ecuación 3, un nuevo factor que se relacionaría directamente con la constante cinética involucrada en la salida de soluto desde el espacio intravascular hacia cada espacio extravascular de los diferentes tejidos u órganos [2]. A este factor lo hemos denominado como “fracción de masa que efectivamente puede transferirse”. Este concepto se asocia con el hecho de que durante cada ciclo de la circulación sanguínea, sólo una fracción de las moléculas aptas para salir del espacio intravascular pasará por la superficie de transferencia, y siempre será así hasta tanto no se cambie la fracción de flujos sanguíneos que alimenta dicha región capilar. Esta estrategia nos ha permitido explicar ciertos desajustes en la relación PK/PD (concentración/efecto) cuando se monitorea la concentración plasmática de fármaco [5].

FARMACOCINÉTICA APLICADA A LA CLÍNICA

El modelo que se muestra en la figura 2 sintetiza todos los aspectos básicos presentados anteriormente, y nos permite comprender los hechos más relevantes de algunos agentes anticonvulsivantes usados con éxito durante mucho tiempo en terapéutica: carbamacepina, ácido valproico, fenitoína. A través de él reseñaremos la absorción, distribución, metabolización y excreción, de las drogas mencionadas.

Biodisponibilidad de medicamentos

La disolución del fármaco en el tracto digestivo constituye la primera etapa, sin la cual sería imposible absorberlo. La diferente relación área/volumen que presentan

estómago e intestino determina que sea desde el lumen intestinal donde más velozmente se transfiere la molécula de fármaco hacia la mucosa. Por tanto, cuando se menciona absorción, inevitablemente se hace referencia al intestino delgado. Una vez en el enterocito existe la posibilidad de que las enzimas allí ubicadas metabolicen la droga. Sin embargo, esta eliminación presistémica es pequeña debido a la elevada concentración de droga que inunda el interior celular, por lo que la velocidad de transferencia hacia el medio interno, es muy alta en virtud de la alta cantidad de soluto allí presente. No obstante, dado que los tres antiepilépticos son sustratos de transportadores de eflujo [6-8] (P-glicoproteína [Pgp], proteína asociada a resistencia de múltiples drogas [MRP2]), ubicados en la membrana apical del enterocito, sus concentraciones intracelulares se reducirán, pudiendo suscitarse alguna competencia metabólica. Sólo carbamacepina es susceptible de eliminarse presistémicamente, ya que es la única sustancia que es sustrato de una enzima muy expresada en el enterocito [9], en tanto que las enzimas a cargo de metabolizar fenitoína y ácido valproico se localizan fundamentalmente en el hígado.

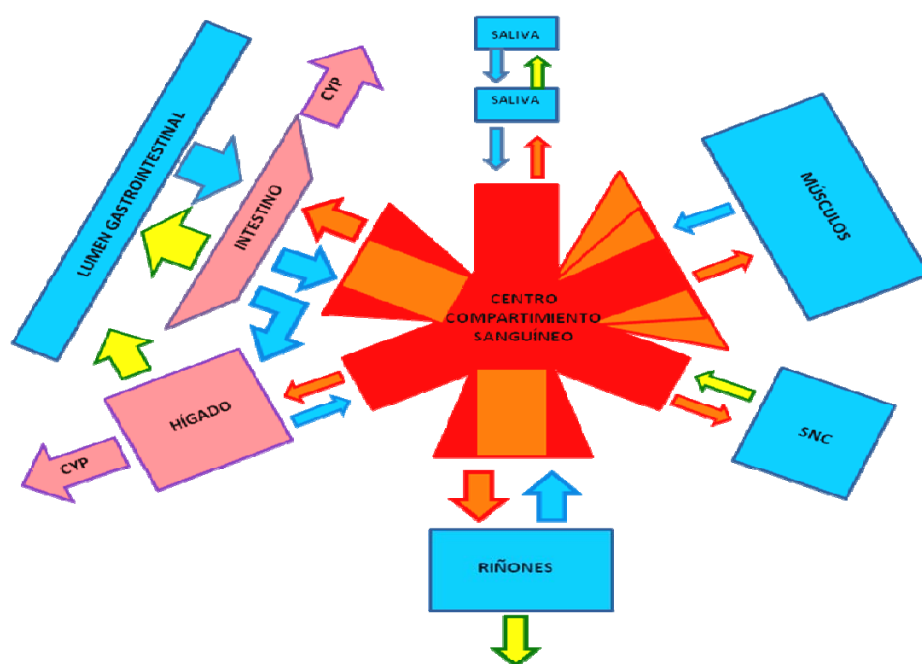


Figura 2. Modelo farmacocinético multicompartmental destacando transferencias consumidoras de energía. Las cinéticas de transferencia hacia espacios extravasculares responden a la distribución de flujos sanguíneos. El compartimiento sanguíneo expande su área de transferencia hacia los músculos esqueléticos a expensas de las regiones esplácnicas (intestino) y renal. Los transportes de eflujo están localizados en la figura transfiriendo masa desde SNC hacia sangre, desde hígado y mucosa intestinal hacia el lumen gastrointestinal, desde los riñones hacia el exterior, y desde las células ductales hacia la luz de los conductos salivales.

Después de sortear la primera línea de contención, las drogas entran al espacio intravascular tras lo cual pueden penetrar al hepatocito en su primer pasaje hepático, o seguir hacia la circulación sistémica a través de las venas: hepática, cava inferior, cava, cavidades cardíacas; arteria y vena pulmonar; y finalmente arteria aorta. Se dice por tanto que los fármacos están disponibles para todos órganos, cuando arriban a la arteria aorta. La cantidad y velocidad con la cual llegan hasta ahí se conoce como biodisponibilidad, y es característica del medicamento y de la vía de administración, además ciertamente de la capacidad biológica que cada individuo. El ingreso al hepatocito podría significar una eventual pérdida adicional de biodisponibilidad, aunque la expresión de transportadores de eflujo a nivel de la membrana hepatobiliar podría conducir a estas moléculas antiepilepticas nuevamente al lumen intestinal, y así esquivar el metabolismo por las enzimas hepáticas. Por lo tanto, la mayor participación en la eliminación presistémica estaría dada a nivel intestinal y no hepático, como antiguamente se presumía.

Por lo mencionado previamente, la carbamacepina no alcanzaría un rendimiento del 100% de biodisponibilidad, debido a metabolismo presistémico intestinal. El ácido valproico presenta condiciones óptimas para una completa biodisponibilidad oral, en la medida que se administre bajo formas farmacéuticas de liberación inmediata. Un enlentecimiento de la disolución intestinal, tal el caso de especialidades de liberación prolongada (LP) conteniendo divalproato de sodio, podría disminuir la biodisponibilidad dado que la fuerte ionización a nivel intestinal reduciría la fracción termodinámicamente apta para la absorción, y por consiguiente la persistente competencia que ejercería el tránsito intestinal del remanente no absorbido hacia zonas aún más alcalinas provocaría pérdidas estimadas de hasta 20% [10]. La fenitoína tiene como principal contratiempo la disolución en el tracto digestivo, ya que ni la ionización, ni la metabolización presistémica jugarían en contra de su completa biodisponibilidad.

Disposición de fármacos

Una vez disponibles sistémicamente, las moléculas de fármaco se dirigirán a los diferentes espacios extravasculares guiadas por la fuerza que imprime su alta concentración libre en plasma, y por aquellas que el organismo ejerce mediante gasto de energía. Entre la sangre y los diferentes tejidos se establecen intercambios

de acuerdo a principios característicos de cada momento del día. Aproximadamente el 15% de las moléculas presentes en la sangre de un individuo en reposo pasa frente a la barrera hematoencefálica en cada ciclo de circulación, 20% por los capilares renales, 20% por los capilares del intestino e hígado (vía porta), y 10% por los capilares hepáticos adicionados por la arteria respectiva. Dichos porcentajes, como veremos en otro capítulo, se modifican según la actividad física, la complejidad física del paciente, según la edad y los estados fisiopatológicos.

Pese al gran suministro de masa que reciben los riñones, menos de un 5% de la eliminación de estos tres anticonvulsivantes se excreta incambiadamente por la orina. Sus altas lipofilias a los pHs urinarios les permiten una intensa reabsorción tubular luego de sus filtraciones a través del glomérulo, la cual sobrepasa sensiblemente a la secreción mediada por los transportadores de eflujo dispuestos en la cara luminal del epitelio tubular. Dichas lipofilias explican la buena penetración al cerebro que poseen, aún cuando en el endotelio capilar se ubiquen también estas bombas de eflujo, direccionado el retorno hacia sangre, y aún cuando tales drogas presenten bajas fracciones libres en plasma (10% para ácido valproico y para fenitoína).

La importante masa que circula por la región esplácnica, aunado a la fácil penetración al interior de las células hepáticas e intestinales, y al mecanismo de eflujo que retiene por más tiempo a las moléculas frente a sus enzimas metabolizadoras, explican la alta tasa de biotransformación que presentan estas sustancias.

Administración crónica de medicamentos

Un hecho relevante de la carbamacepina es su capacidad autoinductora del metabolismo, tanto por sobreexpresar CYP3A4 como MRP2 [6,11] a nivel intestinal y hepático, mediante un mecanismo transcripcional [12-13] actuando sobre receptores nucleares de pregnano (PXR) y androstano (CAR). Su capacidad inductiva es tanto tiempo, como concentración dependiente, lo cual significa que desde la primera exposición al fármaco hasta varios días de administrar múltiples dosis se incrementa la expresión celular de tales proteínas. También significa que al aumentar la dosis diaria en el paciente, se obtenga una progresiva disminución de la biodisponibilidad y un progresivo aumento de la depuración sistémica (*clearance*),

en base a la inducción que provocan las progresivas concentraciones logradas en intestino e hígado ni bien van ingresando las dosis administradas. Esta inducción concentración-dependiente a nivel esplácnico es la causa de la conocida respuesta farmacocinética no lineal (concentración plasmática vs. dosis diaria) de la carbamacepina, consistente en un menor aumento de la concentración sistémica en relación con el aumento de dosis.

Por los mismos mecanismos, anteriormente citados, la fenitoína induciría las enzimas CYP2C19 y CYP2C9, encargadas de su metabolización, y al transportador MRP2. Sin embargo se observa una respuesta farmacocinética no lineal inversa a la registrada para carbamacepina. Es decir, un aumento mayor en la concentración sistémica respecto al aumento de la dosis diaria. Habitualmente se interpreta el fenómeno como el resultado de una inhibición enzimática progresiva tras el incremento de las concentraciones sistémicas, procediendo a eliminarse con cinética de tipo Michaelis-Menten y ya no de orden uno. Sin embargo, otra hipótesis compite con ésta, y es que un incremento de la expresión de bombas MRP2 a nivel de la membrana hepatobiliar podría reducir sensiblemente la concentración hepática de la droga y con ello disminuir la velocidad de eliminación de primer orden [14], proceso que en su inmensa mayoría transcurre en el hígado dada la baja expresión enzimática intestinal.

Con el ácido valproico sucede un fenómeno muy interesante de comentar en relación a la respuesta no lineal observada dosis-concentración plasmática. El aumento progresivo de las concentraciones plasmáticas que origina un aumento de la dosis diaria, conduce a que la unión de la droga a la albúmina se comience a saturar, por lo que la fracción libre en plasma también aumenta progresivamente, y por consiguiente, la constante cinética de transferencia al exterior del espacio intravascular. Dado que el volumen físico del plasma no se modifica, el *clearance* y por lo tanto la concentración plasmática total no logra arribar al valor de equilibrio que impone una velocidad de reposición más alta. Por lo tanto, la concentración aumenta en menor proporción de lo que la dosis lo hace (respuesta farmacocinética no lineal [15]). Esto es debido al acortamiento de la distancia a la superficie de salida por reducción del volumen compartimental combinado (figura 1b), sin alteración del volumen físico plasmático. Sin embargo, según lo visto al tratar el primer concepto

básico de la transferencia de masa, la concentración plasmática libre de equilibrio es directamente proporcional a la velocidad de reposición, es decir a la dosis diaria en este caso, dado que el *clearance* de fármaco libre en plasma se mantiene constante. Por lo tanto, la concentración plasmática libre de valproico resulta lineal respecto a la dosis administrada [16]. Esto es muy importante dado que el efecto farmacológico, que se relaciona con la concentración de valproico en el sitio de acción, y con la concentración plasmática libre, no debe modificarse aún cuando la concentración plasmática total se modifique por su unión a proteínas plasmáticas.

Una conclusión trascendente que se deriva de lo anterior es asumir que el mejor seguimiento farmacocinético que pueda hacerse de la terapéutica anticonvulsivante será siempre hecho a través de la medición de concentraciones libres de fármaco. Una reciente investigación realizada con ácido valproico en ancianos permitió no sólo verificar lo mencionado, sino descubrir que la respuesta farmacocinética de la droga libre en plasma tiene un comportamiento no lineal, del tipo fenitoína. Es decir que a elevadas dosis operarían un mecanismo que disminuiría el *clearance* del sistema [17]. Sin dilucidar por el momento la razón del fenómeno, algunas hipótesis podrían plantearse: a) inhibición metabólica ejercida por metabolitos del propio ácido valproico [18]; b) inducción de transportadores de eflujo [19], operando de modo similar a lo especulado para explicar la cinética no lineal de fenitoína.

SITIOS DE MONITORIZACIÓN

La figura 2 destaca tres sitios relevantes: el cerebro, la sangre, y la glándula salival. No hay duda de que las concentraciones cerebrales de antiepilépticos explicarían enteramente sus acciones sobre las neuronas, aunque sabido es que los efectos de las drogas no son sólo consecuencia de sus acciones, sino también de sus interacciones con otros agentes endógenos o exógenos (pro y anticonvulsivantes). Sin embargo, por el momento no es posible medir tales concentraciones de fármaco, y es por ello que se las subroga por otras más accesibles, como las presentes en el plasma sanguíneo.

Si bien la sangre presenta condiciones propicias para realizar el monitoreo farmacocinético, por su abundancia y accesibilidad, así como por estar en contacto con todos los tejidos corporales, el seguimiento de las concentraciones plasmáticas

ha mostrado desajustes en la correlación PK/PD, lo cual alimentó hipótesis sobre el inadecuado control de la terapéutica mediante el monitoreo cinético, sin advertirse que la razón está en la distancia que media entre la medición en plasma y la simultánea concentración presente en la biofase. En primer lugar, la sangre extraída habitualmente procede de una vena del aparato circulatorio ajena al órgano que contiene los sitios de acción, por lo cual la información que se mide no proviene directamente del lugar que se desea controlar. Un trascendente hallazgo fue verificar la previsible diferencia de concentraciones de fármaco que existe entre arteria y vena a lo largo del tiempo [20]. La figura 3 muestra cómo la concentración venosa de un ingrediente activo subestima la correspondiente concentración capilar durante la absorción, en tanto que la sobreestima durante la fase de eliminación. Esto ya marca un desfase entre la medición que se realiza en plasma venoso, con la que debiera obtenerse en el capilar que irriga el órgano objetivo, y por lo tanto con la concentración tisular correspondiente. Las implicancias farmacodinámicas fueron notablemente registradas tras la administración de nicotina en humanos [21]. En segundo lugar, el monitoreo de concentraciones plasmáticas de drogas normalmente es realizado sin distinguir la fracción libre de la unida a proteínas. Por lo que la información derivada de estos análisis carece de la fineza requerida para llegar a un adecuado relacionamiento PK/PD, dado que los intercambios de masa con los sitios de acción (extravasculares) están conducidos, como discutimos previamente, por la porción libre de fármaco la cual difunde a través de fluidos acuosos.

Saliva como fluido de monitorización

La glándula salival, produce un fluido que tiene varias ventajas respecto al plasma sanguíneo [22]. Por un lado, las drogas vertidas a la saliva se encuentran casi totalmente libres, es decir la unión es muy baja, principalmente por la muy baja concentración de macromoléculas ligantes. En segundo lugar, dicha concentración salival de fármaco se alcanza como fruto de un equilibrio con los espacios acuosos que conforman la glándula, y en última instancia con la concentración libre en el plasma circulante por los capilares que irrigan el tejido glandular. Finalmente, tanto el volumen que puede recogerse de saliva, como el muestreo indoloro y no invasivo que implica obtenerla, hacen de este fluido un ventajoso subrogante del plasma sanguíneo.

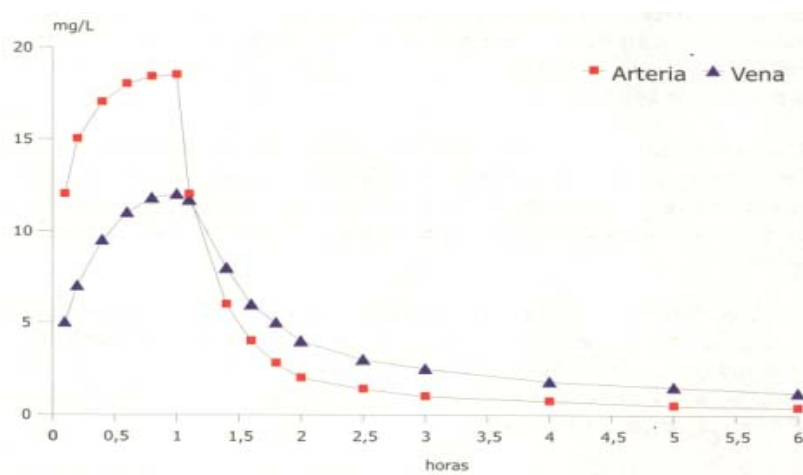


Figura 3. Concentraciones de fármaco en arteria y vena de la gran circulación luego de iniciada la absorción sistémica y durante la eliminación desde el organismo. Considerando que el nivel en sangre capilar es intermedio entre ambas curvas, se puede inferir que la concentración plasmática venosa de un fármaco subestima, durante la absorción, y sobreestima, durante la eliminación, aquella que está en contacto con los tejidos.

La formación de saliva por la glándula sigue un proceso que es esquematizado en la figura 4. Los capilares que irrigan las células del acino, filtran su contenido, como en la mayoría de los tejidos, pasando así el fármaco al espacio intersticial. Atravesando el acino se obtiene una saliva que inicialmente no difiere en composición de la del líquido intersticial. Luego en su trayecto por los conductos salivales se producen intercambios con las células ductales para así arribar a una concentración típica de fármaco en saliva, dependiente de las características fisicoquímicas de la molécula y del pH salival final. Para drogas no ionizables a pH plasmático y salival, tal los casos de fenitoína y carbamacepina, se ha obtenido un paralelismo muy significativo entre los cocientes de niveles saliva/plasma (S/P) de fármaco y los previstos para el cociente capilar/venoso del mismo. Para drogas ionizables, tal el caso de ácido valproico, se recupera el paralelismo corrigiendo por los pHs de plasma y de saliva. Un fenómeno muy interesante es que la velocidad de secreción salival durante el muestreo afecta sensiblemente la concentración salival de fármacos, al punto de que distintas fracciones de saliva recolectadas secuencialmente mostraron diferentes concentraciones de analito [23]. La explicación está en que a medida que se prolonga el muestreo se obtienen fracciones que no alcanzan a equilibrarse en los conductos. Por lo tanto, tales concentraciones se asemejan a las que habría en los acinos, y aún en el plasma libre capilar. Como consecuencia de este fenómeno puede afirmarse

que estimulando la salivación, masticando polietileno o poniendo algunos cristales de ácido cítrico sobre la lengua, se logran concentraciones salivales con menor variabilidad intraindividual.

Monitoreo salival de antiepilepticos

El monitoreo salival de anticonvulsivantes ha tenido una importante aplicación clínica con muy buenos resultados en la individualización posológica, tanto de pacientes adultos como pediátricos. El seguimiento de la terapéutica puede ser hecho recolectando muestras salivales a diferentes horas del día, dada la fácil manipulación por parte del mismo paciente o de familiares, permitiendo correlacionar episodios críticos con concentraciones de fármaco. Ha permitido reafirmar que las ventanas terapéuticas de cada fármaco son propias de cada paciente, siendo tales franjas terapéuticas menos variables cuando se miden concentraciones en saliva, que cuando se miden niveles plasmáticos totales. Tal conclusión no es más que el resultado de una mayor aproximación entre las concentraciones medidas y las concentraciones responsables de los efectos. Sin embargo hay que ser conscientes de que no estando en el propio sitio donde se desarrollan los eventos farmacodinámicos, podrían presentarse aún observaciones paradójicas o de compleja interpretación.

Las concentraciones salivales de ácido valproico han mostrado cierta dependencia con el estado clínico, al punto de detectarse mayores niveles que los esperados en función de la dosis recibida, en pacientes con alta frecuencia de crisis convulsivas en relación a pacientes controlados clínicamente [24]. Este sorprendente hallazgo constituye la punta de un iceberg que nuestro equipo de investigación [25] tiene cifradas esperanzas de desvelar en el futuro próximo. En relación con este evento se plantean diferentes hipótesis: 1) que la disímil concentración de fármaco, entre pacientes controlados y no controlados, sea consecuencia de la dosis administrada; 2) que tal diferencia sea consecuencia de la fisiología cardiovascular o neuronal periférica puesta en marcha ante frecuentes eventos críticos; o 3) que la frecuente crisis origine órdenes hacia puntos tan distantes como los órganos y barreras que separan el medio interno del externo (glándulas salivales incluidas), sobre-expresando transportadores de eflujo [26] con la misión de excretar alguna

proporcionadas al transporte de eflujo en la cara luminal de las células ductales. En cambio la concentración presente en la segunda fracción (S2) se acercaría al valor contenido en el plasma capilar que irriga los acinos glandulares. Cuanto más fracciones se colectaran se arribaría a un cuasi filtrado plasmático de solutos de rápida transferencia por el endotelio vascular (drogas lipofílicas).

A nivel local, tanto las fibras simpáticas como parasimpáticas promueven la secreción de saliva, siendo el sistema nervioso central quien ejerce el mayor control de la salivación. Por lo tanto, no habría de esperarse demasiado impacto de las acciones locales vasoactivas de origen autonómico en el cociente S1/S2, dado que un eventual aumento de la masa transferida se diluiría mediante un aumento de la cantidad de agua también filtrada. Sin embargo, la circadiana tonicidad vascular en grandes territorios de la gran circulación, provocando que la presión sanguínea tenga su máximo en las primeras horas del período diurno, hace que las fracciones de flujo sanguíneo en regiones extra-esplácnicas-renales aumenten sus valores, y por consiguiente las respectivas transferencias de solutos. Se presume que el mayor cociente S1/S2 de concentraciones de fármaco durante la mañana que durante las horas vespertinas [27] sea consecuencia de la redistribución del gasto cardíaco a lo largo del día, aún cuando no deba descartarse la influencia de una posible circadianidad en la expresión de transportadores de eflujo.

Recientes investigaciones demostraron que la administración crónica de carbamacepina (CBZ) no sólo inducía la expresión de MRP2 en la mucosa intestinal [6] sino también el transporte de eflujo a nivel de la glándula salival [25]. La administración a voluntarios sanos de 400 mg diarios durante 7 días, mostró que el cociente S1/S2 matinal respondía a la concentración S2 de CBZ con un desfase de aproximadamente 48 horas, situando en 1.5 mg/L la mínima concentración libre efectiva para dicha inducción. En pacientes epilépticos se registró no solo la inducción metabólica de CBZ hacia la formación de carbamacepina-10,11-epóxido (EPOX), sino un claro paralelismo entre las relaciones EPOX/CBZ y S1/S2 de CBZ *versus* dosis diaria de CBZ (figura 5), lo cual resalta en el mismo escenario clínico dos hipótesis trascendentes de la farmacocinética de esta droga: 1) el fármaco induciría el transporte de eflujo más allá del enterocito, como el caso de la glándula salival; 2) la inducción del transporte de eflujo tendría un rol esencial en el metabolismo

presistémico [14], reduciendo la biodisponibilidad de CBZ y aumentando la biodisponibilidad de EPOX [28].

No obstante esta acción propia de la droga antiepiléptica, la eventual inducción generalizada del transporte de eflujo por parte de un estado no controlado de las crisis convulsivas resulta igualmente vigente, dado que pacientes con alta frecuencia de crisis mostraron mayor cociente S1/S2 de CBZ que otros con buen control de las crisis, aún cuando recibieran ambos similares dosis diarias de CBZ (25).

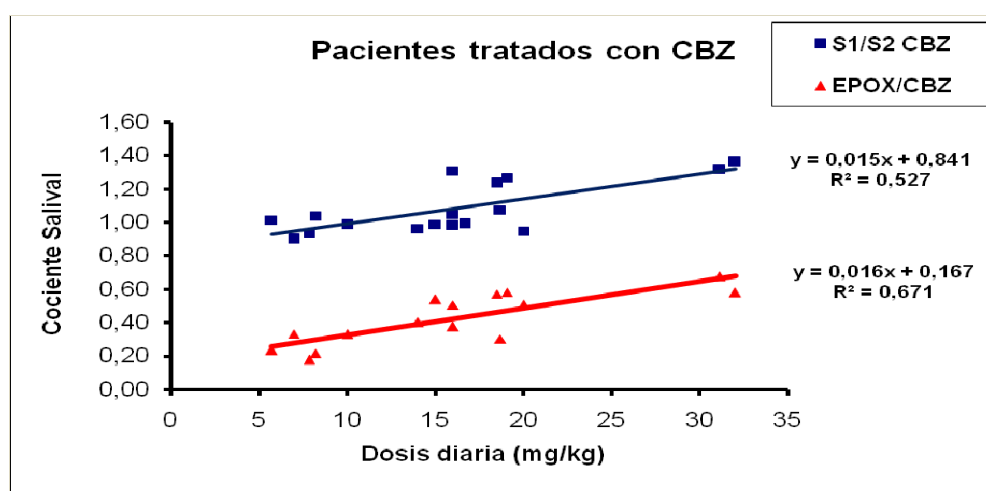


Figura 5. Paralelismo entre los cocientes de concentraciones salivales (metabolito [epóxido de carbamacepina] / carbamacepina) o concentraciones salivales de carbamacepina (1ª fracción / 2ª fracción) y la dosis diaria de carbamacepina recibida por pacientes epilépticos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El monitoreo salival de anticonvulsivantes resulta ser una técnica muy efectiva en el seguimiento farmacoterapéutico de la epilepsia. La medición de concentraciones en muestras salivales obtenidas por estimulación sería la mejor forma de llevarlo a cabo. Si fuera posible extraer la saliva al menos en dos fracciones, se podría tener una clara visión de la cantidad de droga disponible en la circulación sanguínea (S2), para uso del cerebro, al tiempo que mediante el cociente S1/S2 podrían construirse hipótesis referidas a la causa de un inadecuado control de las crisis y alimentar así la toma de decisiones al respecto. Para extender la aplicación de los conceptos enseñados en este capítulo a los nuevos fármacos disponibles en el mercado, se presentan en la tabla I las características farmacocinéticas más salientes de tales drogas antiepilépticas.

Tabla I.

Fármaco	Metabolismo % dosis enzima	Excreción ¹ % dosis	Bomba Eflujo	UPP %	t _{1/2} (h)	Vd (L/Kg)	F % dosis
Felbamato	40 CYP3A4/2E1	50	P-gp	25	20	0.8	90
Gabapentina	despreciable	65	P-gp MRP?	< 5	5-7	0.7	65-35
Lamotrigina	90 UGT1A	8	P-gp MRP2	55	25-30	1.2	> 95
Levetiracetam	25 Hidrolasa	65	P-gp	< 10	5-11	0.6	> 95
Oxcarbacepina ²	50 UGT	30	P-gp	67	8-26	3.3	~100
Tiagabina	90 UGT CYP3A4/2C19	< 2	P-gp	96	7-9	1.3	> 90
Topiramato	20-50 CYP3A4	50-80	P-gp	9-17	20-30	0.7	> 80
Vigabatrina	despreciable	70-80	?	< 5	4-8	0.8	> 80

UPP: unión a proteínas plasmáticas; t_{1/2}: semivida de eliminación; Vd: volumen de distribución en el organismo; F: fracción de dosis oral absorbida.

(1) Excreción renal del fármaco incambiado

(2) Oxcarbacepina es una prodroga convertida casi en su totalidad por la aril-cetona-reductasa citosólica en el metabolito activo monohidroxi-10,11-dihidrocarbamepina (MHD). Los datos aportados se refieren a MHD.

REFERENCIAS

1. Fagiolino P: Farmacocinética y terapéutica. Editor: Fundación para el Progreso de la Química (FUNDAQUIM). Montevideo, 1999; 1-130.
2. Fagiolino P: Multiplicative dependence of the first order rate constant and its impact on clinical pharmacokinetics and bioequivalence. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 29: 43-9.
3. Fagiolino P: The influence of cardiac output distribution on the tissue / plasma drug concentration ratio. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2002; 27: 79-81.
4. Fagiolino P, Wilson F, Samaniego E, Vázquez M: In vitro approach to study the influence of the cardiac output distribution on drug concentration. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2003; 28: 147-53.
5. Fagiolino P, Eiraldi R, Vázquez M: The influence of cardiovascular physiology on dose / pharmacokinetic and pharmacokinetic / pharmacodynamic relationships. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45: 433-48.
6. Geissmann T, May K, Modess C, Wegner D, Hecker U, Zschiesche, Dazert P, Grube M, Schroeder E, Warzok R, Cascorbi I, Kroemer HK, Siegmund W. Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 192-200.
7. Potschka H, Fedrowits M, Löscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 124-31.
8. Gibbs JP, Adeyeye MC, Yang Z, Shen DD. Valproic acid uptake by brain microvessel endothelial cells: role of active efflux transport. *Epilepsy Res* 2004; 58: 53-66.
9. von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, Kivistö KT. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: A comparative analysis I paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 172-83.
10. Fagiolino P, Martín O, González N, Malanga A: Actual bioavailability of divalproex sodium extended-release tablets and its clinical implications. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2007; 13: 75-8.
11. Klotz U. The role of pharmacogenetics in the metabolism of antiepileptic drugs. Pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 271-9.

12. Gerk PM, Vore M. Regulation of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 407-15.
13. Owen A, Golding C, Morgan P, Park K, Pirmohamed M. Induction of P-glycoprotein in lymphocytes by carbamazepine and rifampicin: The role of nuclear hormone response elements. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62: 237-42.
14. Fagiolino P, Vázquez M, Eiraldi R, Maldonado C, Scaramelli A. Efflux transporter influence on drug metabolism: Theoretical approach for bioavailability and clearance prediction. *Clin Pharmacokinet* (accepted).
15. Cloyd JC, Leppik IE. Valproic acid. Therapeutic use and serum concentration monitoring. In: Taylor WJ and Finn AL, editors. *Individualizing Drug Therapy. Practical Applications of Drug Monitoring*. New York: Gross, Townsend, Fran, Inc. 1981; Vol 2: 87-108.
16. Sundqvist A, Tomson T, Lundkvist B. Pharmacokinetics of valproic acid in patients with juvenile myoclonic epilepsy on monotherapy. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 153-9.
17. Felix S, Sproule BA, Hardy BG, Naranjo CA. Dose-related pharmacokinetics and pharmacodynamics of valproate in the elderly. *J Clin Psychopharmacol* 2003; 23: 471-8.
18. Zaccara G, Messori A, Moroni F. Clinical pharmacokinetics of valproic acid - 1988. *Clin Pharmacokinet* 1988; 15: 367-89.
19. Cervený L, Svecová L, Anzenbacherová E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, Ulrichová J, Anzenbacher P, Pavěk P. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1032-41.
20. Lam G, Chiou WL. Determination of the steady-state volume of distribution using arterial and venous plasma data from constant infusion studies with procainamide. *J Pharm Pharmacol* 1982; 34: 132-4.
21. Gourlay SG, Benowitz NL. Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines, and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray, and intravenous nicotine. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62: 453-63.
22. Fagiolino P. Monitorización de fármacos en saliva: aplicaciones biofarmacéuticas, farmacocinéticas y terapéuticas. Editor: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) - Universidad de la República. Montevideo, 1999; 1-121.
23. Haeckel R, Mühlenfeld HM. Reasons for intraindividual inconstancy of the digoxin saliva to serum concentration ratio. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 653-8.
24. Maldonado C, Fagiolino P, Vázquez M, Rey A, Olano I, Eiraldi R, Scavone C. Therapeutic carbamazepine (CBZ) and valproic acid (VPA) monitoring in children using saliva as a biologic fluid. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2008; 14: 55-8.
25. Proyecto Fenotipificación de transportadores de membrana como contribución al control de la variabilidad en la respuesta a los medicamentos (Fagiolino P, et al.), Universidad de la República de Uruguay (aprobado 2008) - Proyecto Latinoamericano de Epilepsia Farmacorresistente en Pacientes Pediátricos (Orozco-Suárez S, et al.) del Gobierno de México (aprobado 2009).
26. Lazarowski A, Czomyj L, Lubieniecki F, Vázquez S, D'Giano C, Sevlever G, Taratuto AL, Busco A, Girardi E. Multidrug-resistance (MDR) protein develops refractory epilepsy phenotype: clinical and experimental evidences. *Current Drug Ther* 2006; 1: 291-309.
27. Fagiolino P, Duré C, Vázquez M. Evaluación del tono simpático en pacientes tratados con fenitoína y carbamacepina. *Acta Farm Bonaerense* 2000; 19: 119-24.
28. Fagiolino P, Vázquez M, Olano I, Delfino A. Systemic and presystemic conversion of carbamazepine to carbamazepine-10,11-epoxide during long term treatment. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2006; 12: 13-6.

MECANISMOS DE RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS EN EPILEPSIAS REFRACTARIAS

^{1,2}Lazarowski A, ³Czornyj L.

¹Instituto de Investigaciones en Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC). Facultad de Farmacia y Bioquímica, y ²Instituto de Investigaciones de Biología Celular y Neurociencias (IBCN), Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

³Servicio de Neurología, Hospital Nacional de Pediatría “Prof. Juan P. Garrahan”, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una enfermedad crónica que se caracteriza por episodios recurrentes de crisis convulsivas o no-convulsivas, debidas a la descarga paroxística, hipersincrónica, excesiva e incontrolada de un gran número de neuronas. Por lo tanto, la epilepsia es la tendencia a tener en forma recurrente dichas crisis que no fueron provocadas por un daño agudo y severo sobre el SNC. Si bien estas definiciones merecen una discusión más extensa, teniendo en cuenta las características clínicas y circunstancias en las que se pueden desencadenar los diferentes tipos de crisis epilépticas, las mismas se producen espontáneamente, como consecuencia de estímulos que en condiciones normales, no logran superar el “umbral de excitación” que protege de dichas crisis en los individuos no-epilépticos.

La Epilepsia es una enfermedad neurológica que afecta aproximadamente a 1-2% de la población general (1). Alrededor del 35% de los síndromes epilépticos resultan secundarios a una amplia gama de etiologías como alteraciones cerebrovasculares, traumatismo, distintos trastornos congénitos metabólicos y/o genéticos, tumores cerebrales, infecciones y enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, el 65% restante de los “Síndromes Epilépticos”, son de origen aún desconocido y se los categoriza como *Epilepsias Idiopáticas*, también denominadas “*Criptognéticas*” (Figura 1). La correcta identificación del síndrome epiléptico, dependiente de su

forma de presentación clínica, edad, y potenciales factores etiológicos (Figura 1), permitirá la selección del fármaco apropiado para el control de la enfermedad en ~60-70% de los casos.

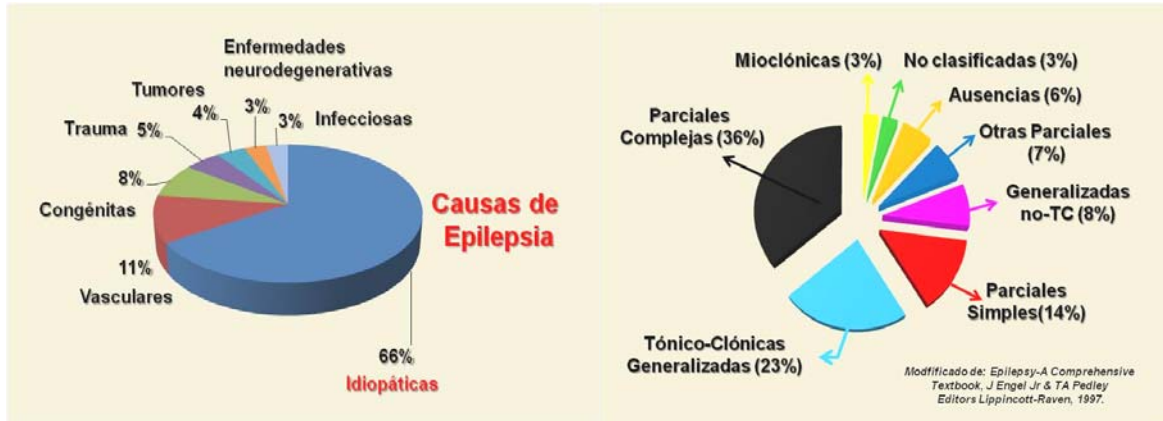


Figura 1. Distribución etiológica (panel izquierdo) y sintomática (panel derecho) de la Epilepsia.

Sin embargo, y a pesar de los considerables avances en la farmacoterapia, cerca del 30-40% de los pacientes epilépticos, no logra un adecuado control de las crisis con los fármacos antiepilépticos (FAEs) (2,3). Estos pacientes, se caracterizan por una pérdida del control de las crisis aún después de la administración de combinaciones de FAEs que difieren en sus estructuras, mecanismos y sitios de acción (4). Este fenómeno clínico de “Múltiple Resistencia” al tratamiento farmacológico (*Multidrug Resistance*), constituye el denominado fenotipo “MDR”, descrito originalmente en cáncer (5, 6) (Figuras 2 y 3).

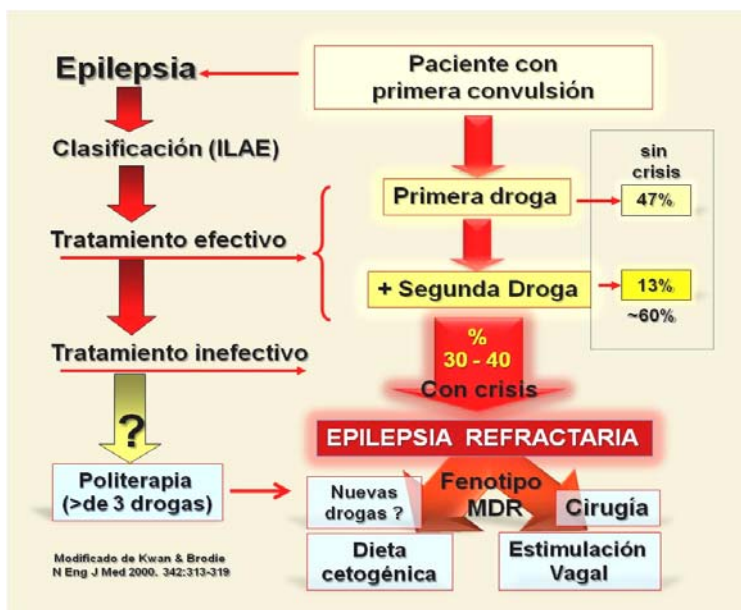


Figura 2. Cuando un paciente tiene su primera crisis epiléptica, se debe establecer la clasificación adecuada, para administrar la medicación más adecuada y ajustar sus dosis. La respuesta será favorable en poco más del 60% de los casos. Sin embargo, entre un 30-40% de los pacientes, no logrará el control de las crisis a pesar del uso de varios FAEs (politerapia), debido a que desarrollarán una Epilepsia Refractoria con fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*).

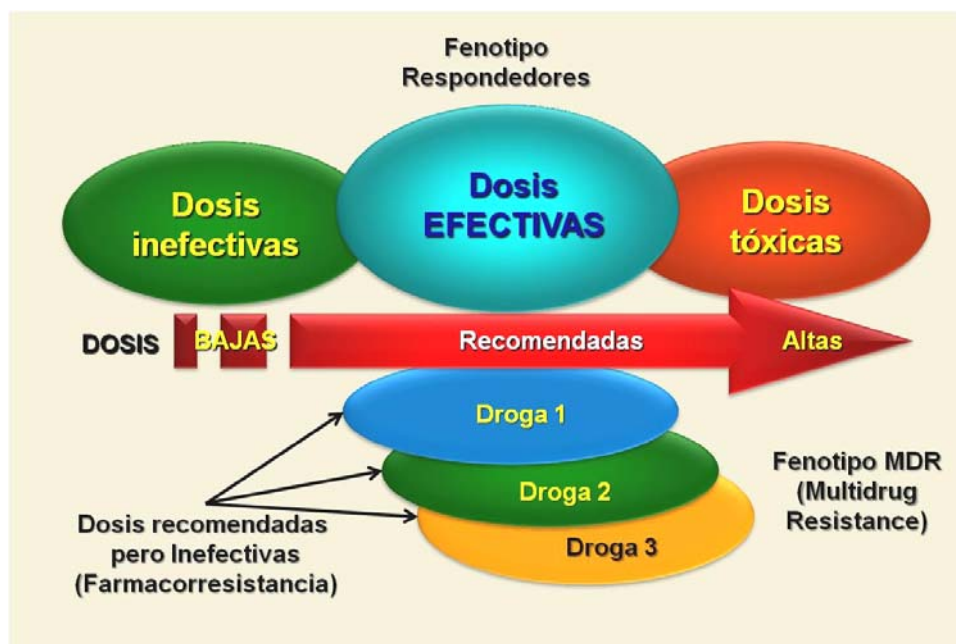


Figura 3. El esquema compara el manejo farmacológico para el tratamiento de la epilepsia en pacientes epilépticos con fenotipo “Respondedores” (arriba) y en pacientes con epilepsia refractaria (ER) que muestran el fenotipo “MDR” (abajo).

MECANISMOS DE FARMACORRESISTENCIA EN EPILEPSIA REFRACTARIA (ER)

Toda circunstancia que implique una limitación en el acceso de los fármacos al SNC, impactará directamente en la pérdida de la eficacia en el tratamiento. Por este motivo, y antes de definir que nos encontramos frente a un cuadro de ER, debemos considerar varios factores no relacionados a la enfermedad epiléptica en sí misma, y que resultan en una disminuida cantidad de FAEs en el SNC, tales como la falta de cumplimiento al tratamiento, la prescripción de dosis insuficientes, la administración de formulaciones inadecuadas, la presencia de interferencias en la absorción y/o distribución de los fármacos, etc. Descartados estos factores, una vez ingresados al cerebro los FAEs deberán alcanzar su “sitio de acción” y lograr acumular la mínima concentración “necesaria y suficiente” que le permita interactuar con su “blanco”, acorde al coeficiente de afinidad de unión que cada fármaco tiene por dicho “blanco”. De esta forma, se logrará la máxima eficacia sobre las “neuronas epilépticas” con mínima toxicidad sobre el resto del SNC.

Este paradigma de la farmacoterapia (compartido con otras entidades clínicas), se desploma a la hora de encarar el tratamiento en pacientes quienes repetidamente fallan en controlar sus crisis a pesar del tratamiento con diversas combinaciones de FAEs y desarrollan una Epilepsia Refractaria (ER) con fenotipo MDR. Dos grandes

mecanismos han sido descritos para esta falta de respuesta (7). Uno de los cuales, está relacionado con modificaciones en el “Blanco Terapéutico”, que por alteraciones estructurales o pérdida de su expresión, no podrán ser reconocidos por los FAEs para el control de las crisis (**Hipótesis del *Target* Modificado**). El otro mecanismo, corresponde a la llamada “**Hipótesis de los Transportadores**”, debida a la alta expresión de diferentes sistemas de transporte de drogas capaces de impedir el acceso, “lavar” y hasta “vaciar” el SNC de FAEs, evitando la acumulación de concentraciones mínimas efectivas de los mismo. Cualquiera de estos mecanismos impedirá en forma separada o coordinada, que los FAEs logren apagar el foco epileptogénico, inhibir la sincronización de neuronas afectadas, y evitar la propagación de la excitación a otras neuronas normales. Probablemente, luego de analizar estos complejos sistemas surja la necesidad de contestar las siguientes preguntas:

- ¿Pueden estos mecanismo estar presentes desde el inicio de la enfermedad, o son consecuencia de un proceso de agravamiento progresivo inducido por la evolución propio de las crisis no controladas?
- ¿Pueden estos mecanismos ser parte de un proceso de eventos que en forma crónica, silente y progresiva desemboquen en un cuadro convulsivo?

Si las respuestas son positivas, ¿cuál es el límite entre la farmacorresistencia y epileptogenicidad?

La hipótesis del *target* modificado

Una de las causas de la “desobediencia farmacológica”, por parte de las neuronas epilépticas observada en los pacientes con ER, se debe a cambios producidos en la expresión, estructura y función de las moléculas “blanco o *target*” de los FAEs administrados. Estos blancos terapéuticos son en su mayoría, responsables del control de la frecuencia y amplitud de la *apertura-cierre* de los canales iónicos dependientes de voltaje y regulan el nivel de polarización negativa del potencial de membrana denominado “umbral convulsivo” (Figura 4).

Tanto en modelos experimentales como en casos clínicos de epilepsia, se ha podido documentar que las propias crisis convulsivas, provocan modificaciones que regulan a nivel transcripcional la expresión de distintas subunidades de los canales iónicos, generando una menor densidad de dichos canales iónicos a nivel de la membrana

celular. De esta forma, los FAEs tendrán menor cantidad de efectores de su acción. Además, las crisis convulsivas pueden afectar las características estructurales de las proteínas constitutivas de las distintas subunidades de dichos canales, generando cambios conformacionales, fallos de anclaje en la membrana, exceso de glucosilación, etc., que generará una pérdida de su sensibilidad al efecto terapéutico de los FAEs. Estos mecanismos han sido descritos en casi todos los canales iónicos relacionados a los FAEs. Y si bien se han registrado distintos cambios en la expresión y función de los canales de Ca-dependientes de voltaje, o de los receptores GABAérgicos, como así también de la corriente entrante de cationes (corriente I_H) en las terminales dendríticas relacionadas con la acción de lamotrigina (7), los datos más significativos han sido documentados en las alteraciones de la corriente entrante de Na^+ (Figura 4).

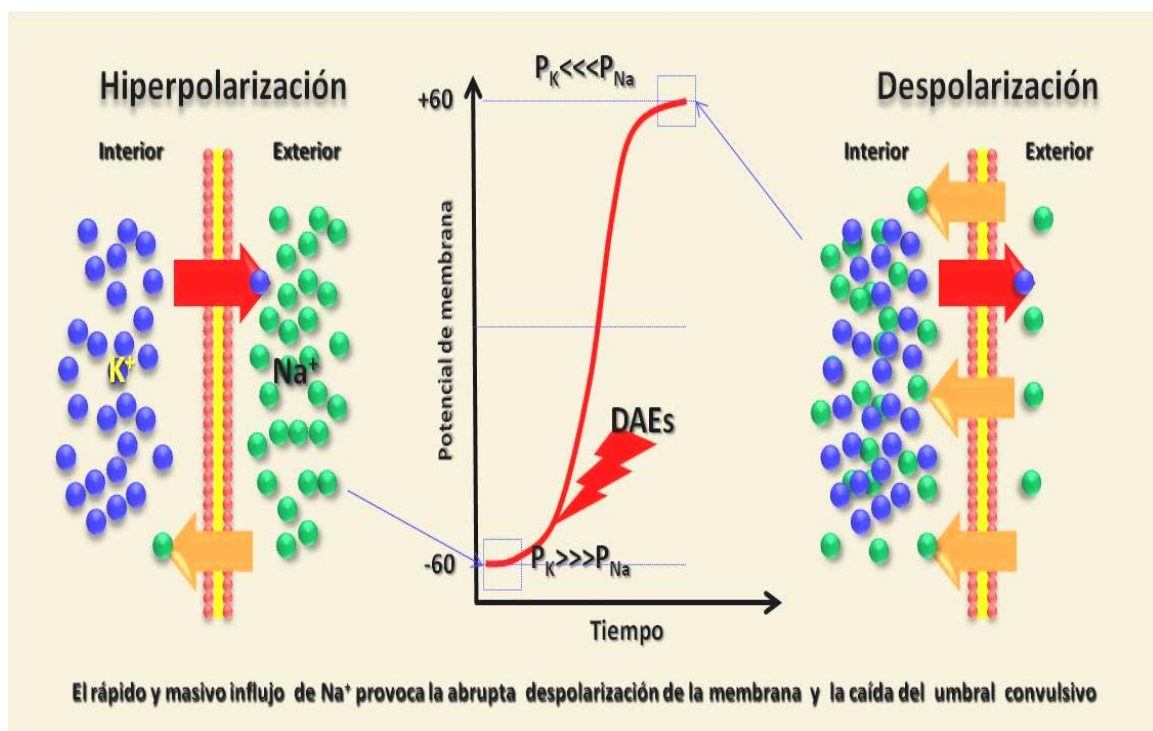


Figura 4. La mayoría de los FAEs, actúan sobre los canales iónicos, intentando frenar el proceso de despolarización, mostrado en la imagen, para evitar así sobrepasar el umbral de excitación y la generación de las crisis.

La mayoría de los FAEs de primera línea, bloquean el influxo rápido de Na^+ manteniendo el estado de hiperpolarización del potencial de membrana, impidiendo la apertura completa del canal de Na^+ , con la consiguiente reducción de la excitabilidad de la célula, y abortando así la descarga convulsiva. En un modelo

experimental de epilepsia crónica se demostró la pérdida de expresión de las subunidades accesorias (β_1 y β_2) de dicho canal, hecho que fue confirmado en varios casos clínicos. Además, también se identificaron modificaciones en la estructura de la subunidad principal alfa del mismo canal, tanto en células granulares dentadas como en neuronas piramidales del hipocampo (Figuras 5 y 6).

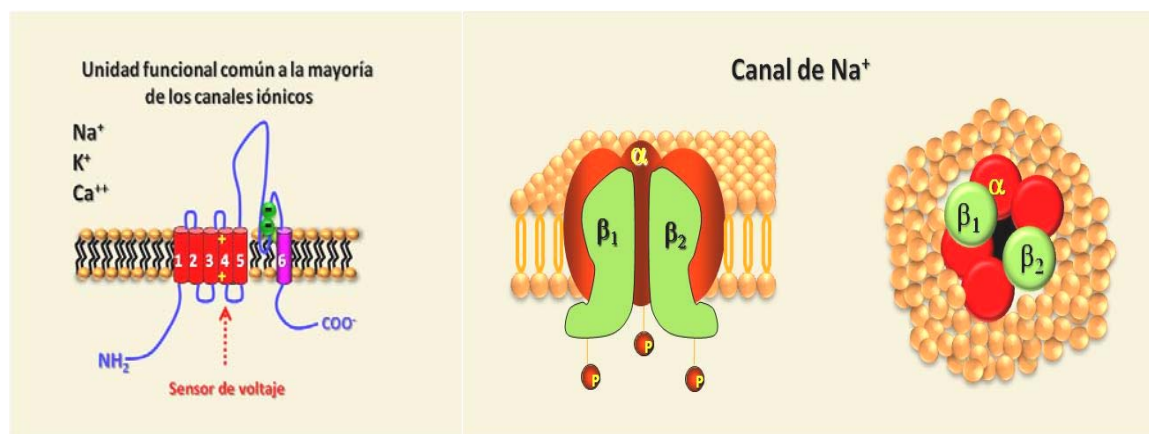


Figura 5. El esquema muestra la unidad funcional común de los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} sensibles a voltaje (izquierda), y las distintas subunidades del canal de Na^+ sensibles a voltaje (derecha).

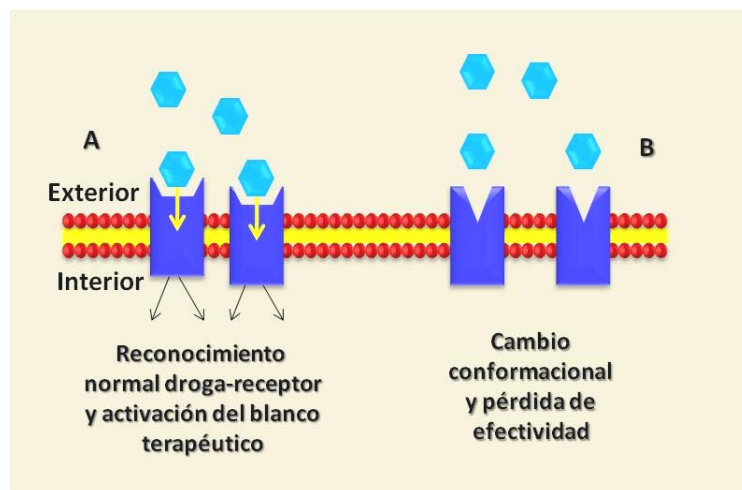


Figura 6. Los cambios estructurales, la menor expresión o los cambios conformacionales en los canales iónicos, producidos por las crisis repetidas (particularmente en los de Na^+), pueden generar pérdida de sensibilidad, por falta de reconocimiento, entre el FAE y su *target* terapéutico, tal y como se muestra en la imagen.

Sin embargo, la “desensibilización” del canal de Na^+ a la acción de los FAEs, no sería aplicable a la pérdida de eficacia observadas tanto con el Ácido Valproico y como con la Lamotrigina (8). Es más, experimentalmente no se han observado alteraciones en la sensibilidad de dicho canal en ratas espontáneamente “no-respondedoras” al tratamiento con difenilhidantoína (DFH) (9). Así, todos estos resultados, relacionados a la “pérdida de sensibilidad”, no pueden explicar el total de casos de

farmacorresistencia, especialmente cuando el paciente está recibiendo una combinación de fármacos con diferentes sitios y modos de acción, y aún así, permanece refractario a tratamiento.

La hipótesis de los transportadores

El fenómeno de Resistencia Múltiple a Fármacos (MDR), fue inicialmente descrito en cáncer, debido a la presencia de un transportador de membrana responsable de expulsar diferentes fármacos antineoplásicas hacia fuera de las células malignas, y capaz de conferir niveles de quimiorresistencia 1000 veces superior al de células que no expresan dicho transportador (5, 6).

Dicho transportador puede expulsar en forma activa e indiscriminada una amplia gama de compuestos y/o droga, desde el interior de la célula, que ingresan por difusión pasiva gracias a su liposolubilidad. Dicho transportador, producto del gen MDR-1, es una glucoproteína de membrana de 170 kD, conocida como glucoproteína P (P-gp), que se expresa normalmente en diferentes órganos excretores jugando un rol desintoxicante y también en la cara luminal de las células endoteliales de la BHE, limitando el acceso de distintas fármacos al SNC (10-13). La glucoproteína P-gp y otros transportadores como BCRP (*Breast Cancer Resistant Protein*) o MRPs (*Mltidrug resistance-associated Proteins*), pertenecientes a la superfamilia de genes “transportadores-ABC (*ATP-Binding-Cassette*), se encuentran normalmente en la cara luminal de las células endoteliales vasculares de la BHE o en la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR), y en el epitelio de los plexos coroideos (14-17). Si bien se ha detectado la presencia “normal” de P-gp en las membranas de los astrocitos, dicha expresión se limita a las extensiones astrogiales relacionadas a los vasos. Su ubicación “polarizada”, asegura un flujo unidireccional de los substratos transportados, siempre hacia el exterior del SNC (18,19). Dado que alrededor de un 70% de pacientes epilépticos, logran una buena respuesta terapéutica con control total de sus crisis, la expresión “normal” de P-gp, BCRP y MRPs en BHE no parece resultar un impedimento para el ingreso de los FAEs al SNC en estos casos. Por lo tanto, un incremento en la expresión y/o funcionalidad de estos transportadores en la BHE, debería estar presente en casos de epilepsias refractarias a distintos FAEs.

Estructura y mecanismos de acción de los transportadores-ABC

La glucoproteína-P (P-gp), pertenece a una gran familia de transportadores caracterizados por poseer dos dominios transmembranales y dos dominios citosólicos, con alta afinidad de unión y capacidad de hidrólisis del ATP, conocidos como “ATP-binding-cassette o Nucleotide Binding Domain” (NBD) (Figura 7). Ya se han reconocido 48 miembros de esta gran familia, 22 de los cuales se relacionan a distintas patologías causadas por sus deficiencias. Sin embargo, la sobre-expresión de algunos de ellos como P-gp, BCRP o MRPs, se relacionan con el fenotipo farmacorresistente MDR (20). BCRP posee un solo dominio transmembranal y un único sitio de unión de ATP, y debe dimerizarse para cumplir su función de bombeo (21). Distintos agentes biológicos, hormonas, oncogenes, o factores de transcripción activados durante la apoptosis, el estrés, la inflamación, o la hipoxia, están involucrados en la inducción génica de la sobre-expresión de estos transportadores, particularmente la P-gp, en tejidos o células que previamente no la expresaban (22-26), como el caso de neuronas y cardiomiocitos (27-29).

También estos mecanismos de inducción son capaces de incrementar la expresión de los transportadores en los tejidos que normalmente los expresan, incrementando su funcionalidad, particularmente en los órganos de barrera y excreción. Se ha sugerido también que P-gp y otros transportadores relacionados al fenómeno MDR, pueden jugar un rol en los procesos biológicos de supervivencia celular (30-32) independiente del fenotipo refractario adquirido.

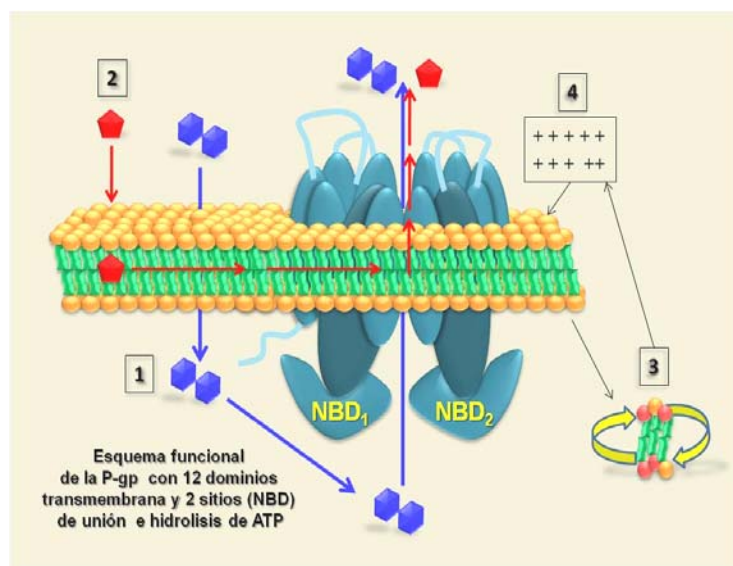


Figura 7. Esquema funcional de la P-gp. **1)** Actividad típica de bombeo de sustancias polares que ingresan por difusión a la célula y son transportadas activamente desde una fracción acuosa citosólica hacia el exterior. **2)** Actividad “vacuum-cleaner”, capaz de absorber del interior de la bicapa lipídica las drogas más liposolubles. **3)** Actividad “Flip-Flop” que modifica la orientación de los lípidos de membrana y repercute en su polaridad. **4)** Despolarización de las membranas, con efectos sobre el coeficiente de partición de las drogas en la bicapa lipídica y pérdida de la afinidad de los fármacos por sus targets.

Los transportadores ABC en epilepsias refractarias

Las primeras evidencias de la sobre-expresión de los transportadores ABC, particularmente P-gp, en el cerebro de pacientes con ER, fue inicialmente documentada en casos de pacientes adultos por Tishler y colaboradores (33), y luego confirmada por nuestro grupo y otros autores (34-38). La sobre-expresión de la P-gp fue detectada en células endoteliales vasculares de la BHE, generando un incremento en la dificultad de ingreso de los FAEs al SNC, pero también se observó su expresión en astrocitos y neuronas (34, 39-41). En estos reportes no se logró determinar si dicha sobreexpresión era una característica constitutiva propia de cada uno de los síndromes epilépticos refractarios analizados en cada caso, o bien era secundaria al estrés convulsivo persistente, o el resultado de una inducción relacionada al tratamiento farmacológico crónico, o bien, la combinación de todas estas circunstancias. Sin embargo, la presencia de células anormales P-gp o MRP positivas, en áreas epileptógenas del parénquima cerebral de distintos síndromes epilépticos refractarios, tales como, tumores disembrionarios, displasias corticales focales, esclerosis hipocámpales o esclerosis tuberosas (36, 42), sugieren una expresión constitutiva en dichas células anormales. Por otra parte, la expresión de dichos transportadores en células normales vecinas a las neuronas displásicas y al parénquima cerebral epileptógeno, apoya la idea de que ambos fenómenos (constitutivo e inductivo) pueden producir dicha sobre-expresión (42). Más recientemente, surgieron evidencias clínicas de la sobre-expresión cerebral en casos de pacientes con ER, de BCRP en BHE y de un transportador citosólico, no perteneciente a la familia ABC, denominado MVP (19,43-45), pero no está establecido aún si estos dos transportadores tienen alguna capacidad de impedir la acción de los FAEs. En tal sentido, nuestro grupo ha recientemente documentado la expresión de BCRP en BHE, neuronas displásicas y células balonadas, en dos casos pediátricos de ER, sin sobre-expresión de P-gp (46, 47).

NIVELES SUBTERAPÉUTICOS PERSISTENTES EN PLASMA DE FAES

Una de las condiciones clínicas que definen un paciente con Epilepsia Refractaria, es el hecho que a pesar de recibir el fármaco más adecuado para su cuadro epiléptico, a las dosis recomendadas, y con documentados niveles plasmáticos dentro del

denominado “rango terapéutico” (RT), el paciente no logra el control de las crisis convulsivas. Sin embargo, en algunos pacientes con ER que se encuentran con politerapia (más de dos FAEs), suele ocurrir que al menos uno de esos fármacos, muestre en repetidos controles de laboratorio, un perfil de niveles plasmáticos francamente por debajo de su RT, o bien en el límite inferior del mismo, aún cuando esté recibiendo dosis altas de dicho fármaco. Este hecho ha sido poco estudiado, y generalmente se atribuye a varias razones como la falta de cumplimiento de la terapéutica prescrita, mala calidad de los medicamentos, fallas técnicas en los procedimientos del laboratorio, o “interacciones entre fármacos” que se acepan empíricamente. Nuestro grupo ha podido demostrar que a tan solo dos horas después de la administración intravenosa de una dosis de carga de DFH, se alcanzan niveles terapéuticos en LCR (48). Entonces, ¿qué explicación podemos dar cuando un paciente con ER que se encuentra internado, recibe una dosis de ataque con DFH como droga de primera línea, administrada por vía endovenosa, y a pesar de ello sigue con crisis, y para nuestro asombro, los resultados del monitoreo plasmático revelan niveles subterapéuticos o “normales bajos” del fármaco, no compatibles con la dosis administrada? Aquí, no podemos asumir problemas de cumplimiento, ni de calidad de la droga, ni de interacción entre fármacos. Nosotros hemos podido observar en dos casos pediátricos de ER tratados quirúrgicamente, que este fenómeno se asoció a la alta expresión de P-gp cerebral encontrada en las piezas quirúrgicas estudiadas (41, 49) sugiriendo que el nivel plasmático subterapéutico de los FAEs, puede ser un marcador subrogante de alta expresión cerebral de P-gp, y que un mecanismo “sistémico” de sobre-expresión del transportador, puede influir en la farmacocinética y biodisponibilidad de los fármacos, tal y como luego se demostró en los estudios de los polimorfismos genéticos del gen MDR-1 (50). La abundante expresión de P-gp, BCRP y MRPs, en intestino y otros órganos excretores, sugiere una fuerte relación entre la baja biodisponibilidad de los fármacos y la “sobre-expresión:hiperactividad” de estos transportadores.

El ^{99m}Tc -hexakis-2-methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc -MIBI), es un compuesto radioactivo no metabolizable utilizado para estudios de perfusión cardíaca, y debido a que es sustrato de P-gp, es útil para pruebas de farmacorresistencia en oncología (51, 52). Sobre esta base, hemos podido demostrar mediante una prueba

centellográfica funcional, que la cinética de excreción hepatobiliar del ^{99m}Tc -MIBI, estudiada en 8 pacientes con ER debidas a esclerosis mesiales temporales, se encontró significativamente acelerada comparada a controles normales y con pacientes epilépticos respondedores. Es más, de dicho grupo refractario, en los cinco casos que fueron tratados quirúrgicamente, se detectó alta expresión cerebral de P-gp en BHE, astrocitos y neuronas del área cerebral epileptógena (53). Cabe destacar una comunicación reciente, que observó alta expresión hepática de P-gp, en ratas con epilepsia crónica, libres de tratamiento farmacológico (54).

FAEs Y BLOQUEADORES DE LOS CANALES DE CALCIO EN ER

Dado que la actividad de los transportadores ABC, y particularmente la P-gp, es dependiente de Ca^{2+} , el uso adyuvante de bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , podría inhibir la actividad de estos transportadores, y ofrecer una alternativa terapéutica en casos de ER. En el reporte pionero de Tishler y colaboradores (33), se pudo demostrar que el uso de verapamil, un reconocido bloqueante cálcico inhibidor de la P-gp, permitió el acúmulo intracelular de DFH en células P-gp positivas, a concentraciones similares a las detectadas en las células controles P-gp negativas. Nosotros, hemos utilizado nimodipina junto a los FAEs en varios casos pediátricos de ER, con niveles subterapéuticos de los FAEs, logrando una mejoría en la respuesta clínica, concomitante a una paulatina recuperación de los niveles plasmáticos de los FAEs (55). Es más, en dos de los casos adultos de ER estudiados con ^{99m}Tc -MIBI, su cinética de excreción hepatobiliar, se enlenteció significativamente, luego de 2 meses de tratamiento con nimodipina, sin modificar el esquema terapéutico con los FAEs. Estos pacientes, mostraron a su vez, una reducción del 50% en la frecuencia de crisis convulsivas (56). Ianetti y colaboradores (57), reportaron un caso de estatus epiléptico refractario al tratamiento agresivo con FAEs, que recuperó el control de las crisis y la conciencia, luego del agregado de verapamil al esquema terapéutico (Figura 8).

P-gp EN MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

Diferentes modelos de epilepsias y estatus epilépticos refractarios, han confirmado la sobre-expresión de la P-gp cerebral en dichos modelos (58-60). Pero quizás la

información más relevante de los estudios experimentales, es que la expresión cerebral de P-gp, puede ser inducida por el propio estrés convulsivo (61-63). Este fenómeno inductivo, pudo ser claramente documentado también en un paciente con ER focal que desarrolló un cuadro de estatus epiléptico fatal (64).

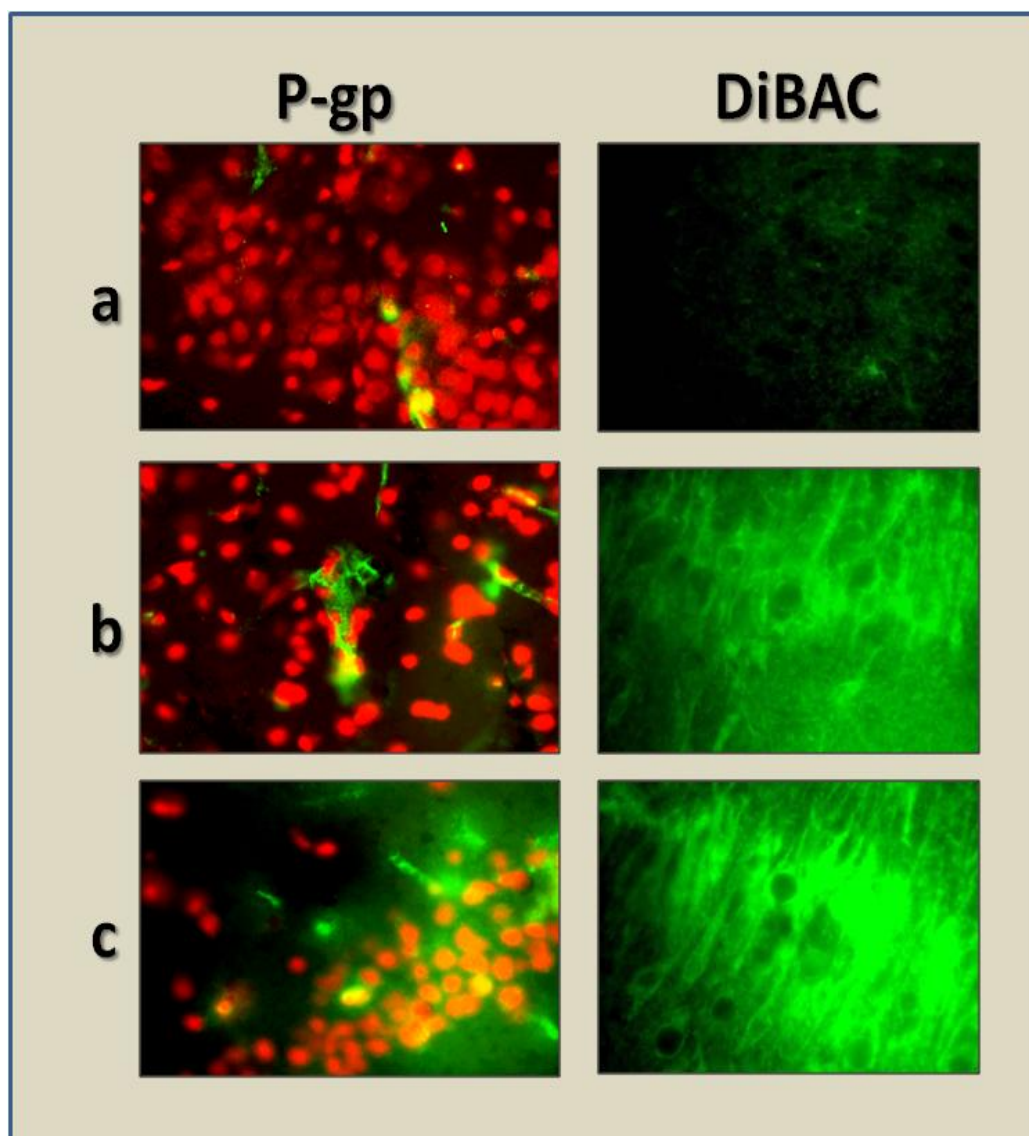


Figura 8. La expresión de la glicoproteína P-gp, se eleva progresivamente a medida que aumenta el número de crisis provocadas experimentalmente, de igual forma la incorporación intracelular del compuesto marcador de despolarización de membranas DiBAC, también se aumenta. Las imágenes corresponden a cortes de hipocampo de ratas sometidas a crisis convulsivas diarias, inducidas por PTZ. a: basales sin crisis; b: 4 días y c: 7 días de inducción de crisis. El 100% de los animales del grupo c, fueron refractarios al tratamiento con DFH. Sin embargo la administración de nimodipina (2 mg/kg) previo a la dosis de DFH, permitió el control de las crisis, y mostró una incorporación de DiBAC intermedia entre a y b (70).

Es importante recalcar que la inducción de P-gp no se limita a la BHE, sino que paulatinamente recluta células del parénquima cerebral como astrocitos y neuronas, y a mayor cantidad de crisis sin “protección” con FAEs, mayor será la cantidad de células cerebrales que expresan P-gp, lo que se correlacionó con una pérdida paulatina del efecto protector de la DFH y una alteración significativa de la cinética hipocampal de la droga (65-67). Finalmente, estos experimentos mostraron que el uso de inhibidores de la actividad de la P-gp junto a FAEs, revierte la refractariedad, recompone la cinética hipocampal de la DFH, y evita el desarrollo del estatus epiléptico (55). A partir de estos experimentos, también podemos asegurar, que la refractariedad en epilepsia puede ser un proceso adquirido e inducible incluso por las propias crisis convulsivas. Estas observaciones experimentales confirman una clara observación clínica, que demuestra que el desarrollo de epilepsia refractaria está directamente relacionado a la frecuencia y número de crisis sufridas antes de iniciar el tratamiento farmacológico (4).

P-gp Y EL UMBRAL CONVULSIVO ¿FARMACORRESISTENCIA O EPILEPTOGENICIDAD?

Finalmente, debemos señalar que las causas que provocan la sobre-expresión de P-gp cerebral son muy variadas. De hecho, la inflamación, la hipoxia, los tumores, las infecciones, los traumas, etc., son factores que pueden inducir la expresión de P-gp, e interesantemente, todas esas condiciones también son posibles causas de crisis o de epilepsias secundarias, por lo que no nos sorprende pensar que en todas estas circunstancias la sobre-expresión de P-gp pueda condicionar la llegada y la eficacia de los FAEs en el SNC.

Vale la pena reflexionar sobre un aspecto poco investigado de este transportador. La expresión de P-gp reduce el “coeficiente de partición” (liposolubilidad) de los fármacos en la bicapa lipídica de las membranas. Este hecho provoca una caída en la constante de afinidad o de unión de los fármacos por su “blanco terapéutico”, y obliga a incrementar significativamente las dosis, a fin de aumentar las concentraciones finales del fármaco en la zona de contacto con su “*target*” para lograr el mismo efecto. Este hecho se debe a que la presencia activa de la P-gp provoca una fuerte caída en el potencial de membrana desde sus valores normales ($\Delta\psi_0 = -60$

mV), hasta valores de pre-despolarización ($\Delta\psi_0 = -10/-20$) en las células que la expresan (68, 69). Este sería un mecanismo “indirecto” de farmacorresistencia, pero más allá de entorpecer o impedir la eficacia terapéutica de los FAEs, tiene a su vez un valor agregado insoslayable en el caso de la epilepsia. Dado que este fenómeno de por sí implica una alteración de las propiedades eléctricas de las células P-gp positivas, creemos que tendría un efecto directo sobre la función de células especializadas normalmente P-gp negativas, como los cardiomiocitos (28, 29) o las neuronas (27, 41, 63), provocando alteraciones en su comportamiento o funciones. Los estudios recientemente publicados por Bauer y colaboradores (71), demuestran la capacidad del glutamato de inducir la sobre-expresión de P-gp, aún cuando es administrado en dosis subconvulsivas. Estos resultados, en conjunto, sugieren fuertemente que la expresión neuronal de P-gp, al generar una pre-despolarización de las membranas neuronales, no solamente sería responsable de la farmacorresistencia sino también, tendría un fuerte impacto en la caída del umbral convulsivo, y de esta forma, la sobre-expresión de la P-gp en las neuronas hipocámpales, se convierte en un factor de riesgo de nuevas crisis, jugando un rol directo en la epileptogénesis. Quizás, debamos postular que ambas propiedades (farmacorresistencia y epileptogenicidad) son simultáneamente ejercidas por P-gp. En base a lo expuesto, vale la pena sugerir que P-gp ha podido explicar y unir dos paradigmas clínicos que establecen que: *“a mayor número de crisis que se repiten sin control, mayor será el riesgo de desarrollar una epilepsia refractaria”* y *“las crisis convulsivas inducen o favorecen nuevas crisis”*. Estos conceptos dieron lugar a la hipótesis del tratamiento anti P-gp, como la nueva estrategia terapéutica contra la epilepsia (72, 73).

FARMACOGENÉTICA

Los FAEs son compuestos lipofílicos con alta capacidad de atravesar las membranas biológicas, entre ellas, la barrera hematoencefálica (BHE). Este hecho, permite deducir que el acceso de los FAEs al SNC, está directamente relacionado a sus niveles plasmáticos. Si bien se espera que cuanto mayor sea la concentración del fármaco circulante mayor cantidad del compuesto accederá al SNC, este concepto varía según las características particulares de mismo y su afinidad de unión a las proteínas

plasmáticas. Sin embargo, existen variaciones individuales, por las cuales no todos los pacientes tendrán la misma capacidad de absorción, distribución y metabolización de Fase 1 y Fase 2 y excreción de los FAEs, por lo que a iguales dosis del FAE administrado, distintas serán tanto sus concentraciones plasmáticas como las que accedan al SNC (Figura 9).

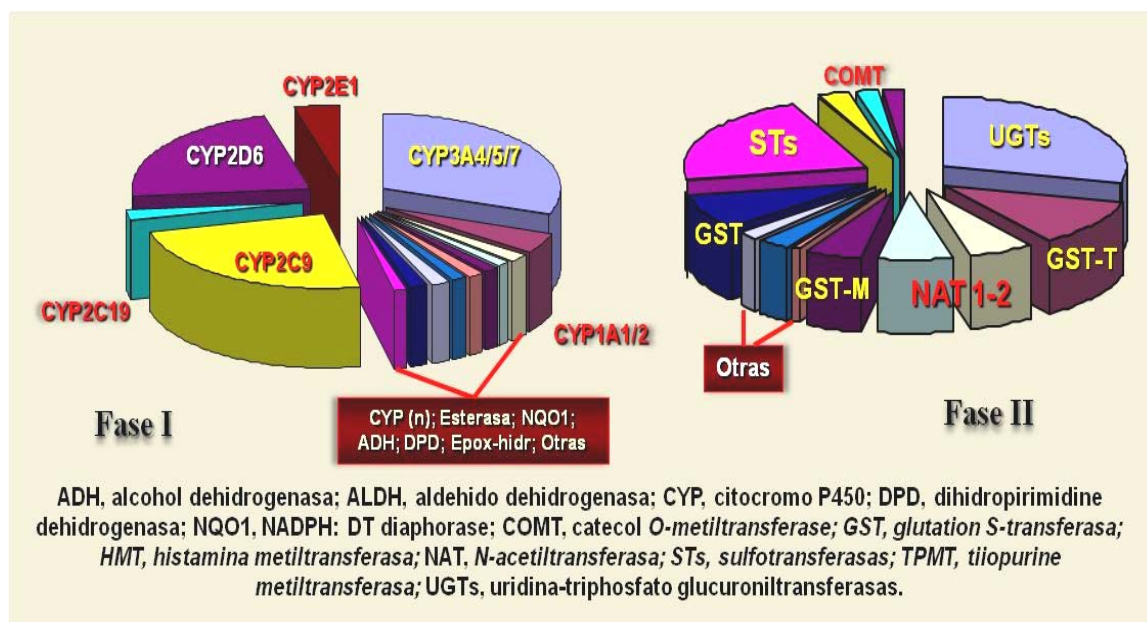


Figura 9: Diferentes polimorfismos de las etapas de metabolización de fármacos que afectan su biodisponibilidad

Estas diferencias, pueden repercutir significativamente en la respuesta terapéutica, y dependen de diferentes polimorfismos genéticos relacionados con todas las etapas del sistema “LADME”, que gobierna la relación Dosis-Respuesta y consecuentemente el efecto terapéutico. El papel de los diferentes sistemas de transporte de fármacos, resulta central en el equilibrio Dosis-Respuesta, y constituye una pieza clave en la ruta desde la propia absorción, hasta la biodistribución, penetración tisular y excreción de las drogas (Figura 10). La combinación de los diferentes polimorfismos de estos sistemas, puede definir perfiles genéticos que modifiquen y desplacen el equilibrio Dosis-Respuesta, y predispongan a un mayor riesgo de desarrollar un fenotipo farmacorresistente, especialmente en los casos con marcadores positivos tanto para los genes relacionados a una alta tasa de metabolización y como aquellos relacionados con mayor capacidad de excreción. Si bien aún los resultados sobre el impacto clínico que estos polimorfismos pueden tener en el tratamiento de la

epilepsia son controvertidos (74, 75) estos estudios pueden proveer de información muy útil para mejorar la estrategia terapéutica, que aumente la eficacia y disminuya los efectos adversos de los fármacos (Figura 9).

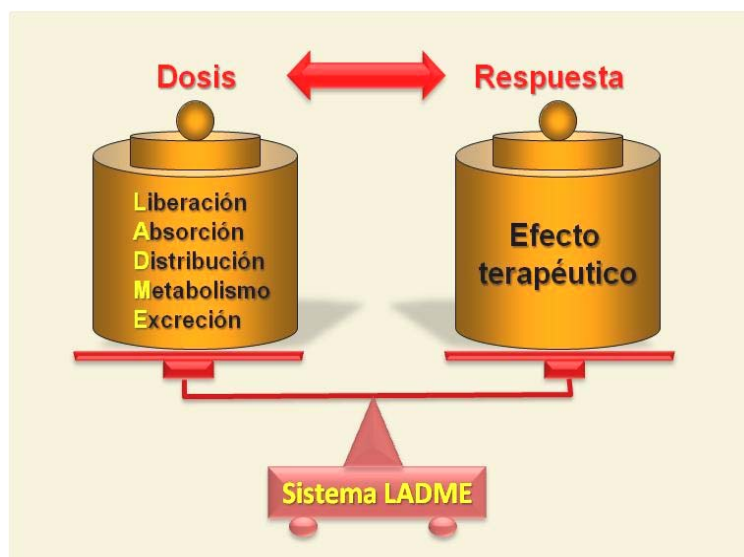


Figura 10. Sistema LADME, que gobierna la relación Dosis-Respuesta y consecuentemente el efecto terapéutico del fármaco.

CONCLUSIONES

Los transportadores ABC, tales como P-gp, MRPs, BCRP y adicionalmente la proteína citosólica MVP, están relacionadas al fenómeno de resistencia múltiple a fármacos en epilepsias refractarias, conocido como “fenotipo MDR”. Estas proteínas son inducibles por diferentes mecanismos incluyendo las propias crisis convulsivas, pueden modificar la biodisponibilidad y acceso de los FAEs al SNC, como así también su farmacocinética sistémica. El conocimiento de sus propiedades y características moleculares, puede brindar nuevas herramientas terapéuticas para las epilepsias refractarias y evitar procedimientos quirúrgicos invasivos. En base a todos estos antecedentes, se ha propuesto que la acción farmacológica sobre la expresión y/o función de la P-gp podría ser un nuevo objetivo terapéutico en epilepsia (72, 73).

REFERENCIAS

1. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy 1981.
2. Collaborative Group for the Study of Epilepsy (1992). Prognosis of epilepsy in newly referred patients: a multicenter prospective study of the effects of monotherapy on the long-term onset of epilepsy. *Epilepsia* 93:45-51.
3. Temkin NR. (2001) Antiepileptogenesis and seizure prevention trials with antiepileptic drugs: meta-analysis of controlled trials. *Epilepsia* 42:515-24.

4. Kwan P, Brodie M. Early identification of refractory epilepsy. (2000) *NEJM*. 342:314–319.
5. Ling V. (1989) Does P-Glycoprotein predict response to chemotherapy? *J Natl Cancer Inst* 81:84-8518.
6. Gottesman M, Pastan I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann Rev Biochem*; 62: 385-427
7. Remy S and Beck H. (2006) Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 129, 18–35.
8. Remy S, Urban B, Elger C, Beck H. (2003) Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *Eur J Neurosci*; 17:2648–58
9. Loscher W, Cramer S, Ebert U. (1998) Selection of phenytoin responders and nonresponders in male and female amygdala-kindled Sprague-Dawley rats. *Epilepsia*; 39:1138–47.
10. Pastan I, Gottesman M. (1987) Multiple-drug resistance in human cancer. *NEJM*;316: 1388–93.
11. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 138:1277–1287.
12. Schinkel A, Smit L, van Tellingen O et al (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to deficiency in the blood brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77:491-502.
13. van Asperen J, Mayer U, van Tellingen O, Beijnen JH. (1997) The functional role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 86;881–884.
14. Rao V, Dahlheimer J, Bardgett M, et al. (1999) Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:3900-5.
15. Beaulieu E, Demeule M, Ghitescu L, Beliveau R (1997). P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J*. 326 (Pt 2):539-44.
16. Eisenblatter T, Huwel S, Galla H. (2003) Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res*. 971:221-31.
17. Zhang W, Mojsilovic-Petrovic J, Andrade MF, Zhang H, Ball M, Stanimirovic DB. (2003) The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB J*. 17:2085-7.
18. Loscher W, Potschka H. (2005) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*. 2:86-98.
19. Lazarowski AJ, Lubieniecki FJ, Camarero SA, et al. (2006) New proteins configure a brain drug resistance map in tuberous sclerosis. *Pediatr Neurol*. 34:20-4.
20. Štefaková J, Poledne R, Hubacek J. (2004) ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Human Metabolism and Diseases. *Physiol. Res* 53: 235-243.
21. Ejendal KF, Hrycyna CA (2002) Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. *Curr Protein Pept Sci*. 3:503-11.
22. Cornwell MM, Smith DE (1993) A signal transduction pathway for activation of the *mdr1* promoter involves the proto-oncogene *c-raf* kinase. *J Biol Chem*;268:15347-15350.
23. Comerford K, Wallace T, Karhausen J, Louis N, Montalto M, Cogle S. (2002) Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res*; 62:3387-3394.
24. Combates NJ, Rzepka RW, Pan Chen Y-N, Cohen D. (1994) NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcription factors, binds and trans-activates the human MDR1 gene promoter. *J Biol Chem* 269:29715-29719.
25. Labialle S, Gayet L, Marthinet E, Rigal D, Baggetto LG. (2002) Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem Pharmacol*. 64(5-6):943-8.
26. Ramos AJ, Lazarowski A, Villar MJ, Brusco A. (2004) Transient expression of MDR-1/P-glycoprotein in a model of partial cortical devascularization. *Cell Mol Neurobiol*. 24:101-7.
27. Lazarowski A, Caltana L, Merelli A, Rubio M, Ramos A, Brusco A. (2007) Neuronal *mdr-1* gene expression after experimental focal hypoxia: A new obstacle for neuroprotection? *J Neurol Sci*;258:84-92.
28. Lazarowski A, Garcia Rivello H, Vera Janavel G, et al. (2005) Cardiomyocytes of chronically ischemic pig hearts express the MDR-1 gene-encoded P-glycoprotein. *J Histochem Cytochem*. 53:845-50.

29. Laguens R, Lazarowski A, Cuniberti L, et al. (2007) Expression of the MDR-1 gene-encoded P-glycoprotein in cardiomyocytes of conscious sheep undergoing acute myocardial ischemia followed by reperfusion. *J Histochem Cytochem.*;55:191-7.
30. Friesen C, Fulda S, Debatin KM. (1997) Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia* 11:1833-1841.
31. Hirose M, Kuroda Y (1998). P53 may mediate the MDR-1 expression via the WT1 gene in human vincristine-resistant leukemia/lymphoma cell lines. *Cancer Lett* 129:165-171.
32. Abolhoa A, Wilson AE, Ross H, Danenberg P, Burt M, Scotto K. (1999) Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma following in vivo exposure to doxorubicin. *Clin Cancer Res.* 5:3352-3356.
33. Tishler D, Weinberg K, Hinton D, Barbaro N, GERALYN A, COREY R. (1995) MDR1 Gene expression in brain of patient with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 36:1-6.
34. D'Giano C, Sevlever G, Lazarowski A, et al. (1997) Expression of P-glycoprotein and related proteins in brain of patients with refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*;38 s7:41,2,58
35. Lazarowski A, Riveros D, Sevlever G, Massaro M, Rabinowicz A. (1997) High expression of multidrug resistance gene (MDR-1) and persistent low levels of phenytoin (PHT) on a patient with refractory epilepsy due to tuberous sclerosis (TS). *J Neurol Sci* 150, S28-#1-17-22.
36. Sisodiya S, Heffernan J, Squier M. (1999) Over-expression of P-glycoprotein in malformations of cortical development. *Neuroreport.* 10:3437-41.
37. Dombrowski S, Desai S, Marroni M, et al. (2001) Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 42:1501-6.
38. Sisodiya S, Lin W, Harding B, Squier M, Thom M. (2002) Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*;125: 22-31.
39. Aronica E, Gorter J, Jansen G, et al. (2003). Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience.* 118:417-29.
40. Volk H, Burkhardt K, Potschka H, Chen J, Becker A, Loscher W. (2004) Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. *Neurosci.* 123:751-9.
41. Lazarowski A, Massaro M, Schteinschnaider A, Intruvini S, Sevlever G, Rabinowicz A. (2004) Neuronal MDR-1 gene expression and persistent low levels of anticonvulsants in a child with refractory epilepsy. *Ther Drug Monit.* 26:44-6.
42. Lazarowski A, Lubieniecki F, Camarero S, et al. (2004) Multidrug resistance proteins in tuberous sclerosis and refractory epilepsy. *Pediatr Neurol.* 30:102-6.
43. Marroni M, Agrawal M, Kight K, et al. (2003) Relationship between expression of multiple drug resistance proteins and p53 tumor suppressor gene proteins in human brain astrocytes. *Neuroscience.* 121:605-17.
44. Sisodiya S, Martinian L, Scheffer G, et al. (2003) Major vault protein, a marker of drug resistance, is upregulated in refractory epilepsy. *Epilepsia.* 44:1388-96.
45. Sisodiya S, Martinian L, Scheffer G, et al. (2006) Vascular colocalization of P-glycoprotein, multidrug-resistance associated protein 1, breast cancer resistance protein and major vault protein in human epileptogenic pathologies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 32:51-63
46. Czornyj L, Lubieniecki F, Camarero S, et al. (2004). Unusual transmantle focal-cortical dysplasia (TD) and Refractory Epilepsy (RE) with brain expression of Breast Cancer Resistant Protein (BCRP). *Rev Mex de Neurociencias* 5, (P73):229.
47. Czornyj L, Lubieniecky F, Pomata H, Lazarowski A. (2005) Breast cancer resistant protein (BCRP) in cortical dysplasia with refractory epilepsy and failure to produce pharmacological coma. *Epilepsia* 46 s1,38:p326.
48. Rabinowicz A, Salvat J, Leiguarda R, et al. (1997) Use of antiepileptic drugs in nontraumatic neurosurgical procedures. Is there any best route and time of administration? *Clin Neuropharmacol.* 20:438-41.
49. Lazarowski A, Sevlever G, Taratuto A, Massaro M, Rabinowicz A. (1999) Tuberous Sclerosis associated with MDR-1 expression and drug-resistant epilepsy. *Ped Neurol* 21:731-4.
50. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. (2000): Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci*; 97:3473.
51. Lacourcière Y, Côté C, Lefebvre J, Dumont M. Noninvasive detection of silent coronary artery disease in patients with essential hypertension, alone or associated with type 2 diabetes mellitus,

- using dipyridamole stress 99m technetium-sestamibi myocardial perfusion imaging. *Can J Cardiol.* 2006;22 Suppl A:16A-21A.
52. Lazarowski A, Dupont J, Fernandez J, et al (2006). 99m Technetium-SESTAMIBI uptake in malignant lymphomas. Correlation with chemotherapy response. *Lymphat Res Biol.* 4:23-8.
 53. Vazquez S, D'Giano C, Carpintiero S, Coronel K, Ugarnes G, Lazarowski A. (2004) Increase 99m Tc-SESTAMIBI (MIBI) liver clearance could identified epileptic pharmacoresistant patients. A preliminary study. *Epilepsia* 7,45:120.
 54. van Vliet E, Aronica E, Redeker S, Gorter J. (2004) Expression and cellular distribution of major vault protein: a putative marker for pharmacoresistance in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45:1506-16.
 55. Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, Girardi E, Vazquez S, D'Giano C. ABC-transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy. *Epilepsia* 48 (Suppl. 5):140-149, 2007.
 56. D'Giano C, Vazquez S, Sevlever G, Lazarowski A. (2005) Calcium antagonist effect on 99m Tc-SESTAMIBI liver clearance in drug-resistance epilepsy. *Epilepsia*, 46 (Suppl. 8):223, #2388.
 57. Iannetti P, Spalice A, Parisi P. (2005) Calcium-channel blocker verapamil administration in prolonged and refractory status epilepticus. *Epilepsia* 46:967-9.
 58. Seegers U, Potschka H, Loscher W. (2002) Expression of the Multidrug Transporter P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells and brain parenchyma of amygdala-kindled rats. *Epilepsia* 43:675-684.
 59. Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, et al. (2004) Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 45:441-51.
 60. Rizzi M, Caccia S, Guiso G, et al. (2002) Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance. *J Neurosci* 22:5833-5839.
 61. Kwan P, Still G, Butler E, Gant T, Meldrum B, Brodie M. (2002) Regional expression of multidrug resistance gene in genetically epilepsy-prone rat brain after single audiogenic seizure. *Epilepsia* 43:1318-1323.
 62. Lazarowski A, Girardi E, Ramos A, García-Rivello H, Brusco A. (2002) Neuronal MDR-1 gene encoded P-Glycoprotein (P-170) Expression in 3-Mercaptopropionic Acid-induced Seizures in Rats. *Epilepsia*; (Suppl.7), 43:11-12.
 63. Lazarowski A, Ramos A, Garcia-Rivello H, Brusco A, Girardi E. (2004) Neuronal and glial expression of the multidrug resistance gene product in an experimental epilepsy model. *Cell Mol Neurobiol.* 24:77-85.
 64. Sisodiya S, Thom M. (2003) Widespread upregulation of drug-resistance proteins in fatal human status epilepticus. *Epilepsia*. 44:261-4.
 65. Girardi E, González NN, Lazarowski A. (2005) Refractory phenotype reversion by nimodipine administration in a model of epilepsy resistant to phenytoin (PHT) treatment. *Epilepsia* 46 (Suppl 6) 212:606.
 66. Lazarowski A, Trida V, Höcht Ch et al. (2006) Alterations in Central Pharmacokinetics of Phenytoin in an Experimental Model of Epilepsy. *Epilepsia*, 47(S4):306-307.
 67. Hocht C, Lazarowski A, Gonzalez N et al. (2007) Nimodipine restores the altered hippocampal phenytoin pharmacokinetics in a refractory epileptic model. *Neurosci Lett.* 413:168-72.
 68. Roepe PD (2000) What is the precise role of human MDR1 protein in chemotherapeutic drug resistance? *Curr Pharm Des.* 6:241-60.
 69. Wadkins RM, Roepe PD. (1997) Biophysical aspect of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Int Rev Cytol* 171:121-165.
 70. Auzmendi J, Orozco-Suárez S; González-Trujano E; Rocha-Arrieta L; Lazarowski A. P-gp contribuye a la despolarización de la membrana plasmática de células del hipo-campo de ratas con epilepsia refractaria a fenitoína (DFH). Vº Cong. Latinoam. de Epilepsia (ILAE), Montevideo (ROU) 5-8 de Noviembre 2008.
 71. Bauer B, Hartz AM, Pekcec A, Toellner K, Miller DS, Potschka H Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Mol Pharmacol.* 2008 May;73(5):1444-53.
 72. Robey RW, Lazarowski A, Bates SE (2008). P-glycoprotein-a clinical target in drug refractory epilepsy? *Mol Pharmacol.*;73(5):1343-6.
 73. Modulating P-glycoprotein regulation: Future perspectives for pharmacoresistant epilepsies? Potschka H. *Epilepsia*. 2010 Apr 30. [Epub ahead of print]

74. Kerb R, Aynacioglu AS, Brockmüller J, Schlagenhauer R, Bauer S, Szekeres T, Hamwi A, Fritzer-Szekeres M, Baumgartner C, Ongen HZ, Güzelbey P, Roots I, Brinkmann U (2001) The predictive value of MDR-1, CYP2C9 and CYP2C19 Polymorphisms for phenytoin plasma levels Pharmacogenomics J.;1:204-210.
75. Loscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. (2009) The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. Epilepsia, 50:1-23.

ESTUDIO DE LAS BASES DE LA FARMACORRESISTENCIA EN LA EPILEPSIA A TRAVÉS DE MODELOS EXPERIMENTALES

¹Rocha L, ¹Luna-Munguía H, ¹Alcántara-González D, ²Cuéllar-Herrera M.

¹Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., y
²Departamento de Neurología del Hospital General de México. México, D.F., México.

La epilepsia se define como una alteración del sistema nervioso central que se asocia con un desequilibrio entre mecanismos inhibidores y excitadores, capaz de involucrar a diferentes sistemas de neurotransmisión y de manifestarse a través de crisis recurrentes, espontáneas e impredecibles conocidas como crisis epilépticas. Dicho desequilibrio involucra un aumento en la transmisión excitadora (mediada principalmente por glutamato) o una disminución de la transmisión inhibitoria (mediada principalmente por GABA), dando origen a lo que se conoce como hiperexcitabilidad de la actividad neuronal, característica principal de la epilepsia (11, 12, 26).

La epilepsia es un trastorno neurológico que afecta a casi el 2% de la población mundial (5, 29). La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es la más frecuente, ya que se observa en el 40% de todos los casos, y se caracteriza por la presencia de crisis parciales complejas, que se generan en estructuras límbicas como el hipocampo y la amígdala cerebral, principalmente (11). A pesar de la terapia farmacológica antiepiléptica, cerca del 30% de los pacientes con ELT presentan fármacorresistencia (24, 31), la cual se define como una condición en la que por lo menos dos fármacos antiepilépticos han fracasado en el control de las crisis epilépticas (4). Aún no se sabe cómo y por qué la epilepsia llega a convertirse en un trastorno farmacológicamente intratable, sugiriéndose una predeterminación genética (la epilepsia es refractaria desde el inicio), así como la influencia de datos

clínicos tales como la duración de la epilepsia, la aparición de crisis epilépticas a temprana edad, un tiempo prolongado sin recibir tratamiento, dosis inadecuadas de los fármacos antiepilépticos, persistencia de las crisis aún con tratamiento, entre otros (4).

Un factor que se ha vinculado con la epilepsia farmacorresistente es el aumento de la expresión de la glucoproteína-P (gp-P). La gp-P es una proteína de transporte localizada en diversos órganos como el intestino, el riñón y el páncreas, así como en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. La función de la gp-P es actuar como una bomba transmembranal la cual remueve al espacio sanguíneo una gran variedad de compuestos estructuralmente diferentes (iones, péptidos, aminoácidos, azúcares) (21, 23). En el tejido cerebral tanto de pacientes como de animales con ELT farmacorresistente, se observa un aumento en la expresión de la gp-P a nivel de las células endoteliales vasculares, así como en astrocitos y neuronas (3, 35) (Figura 1).

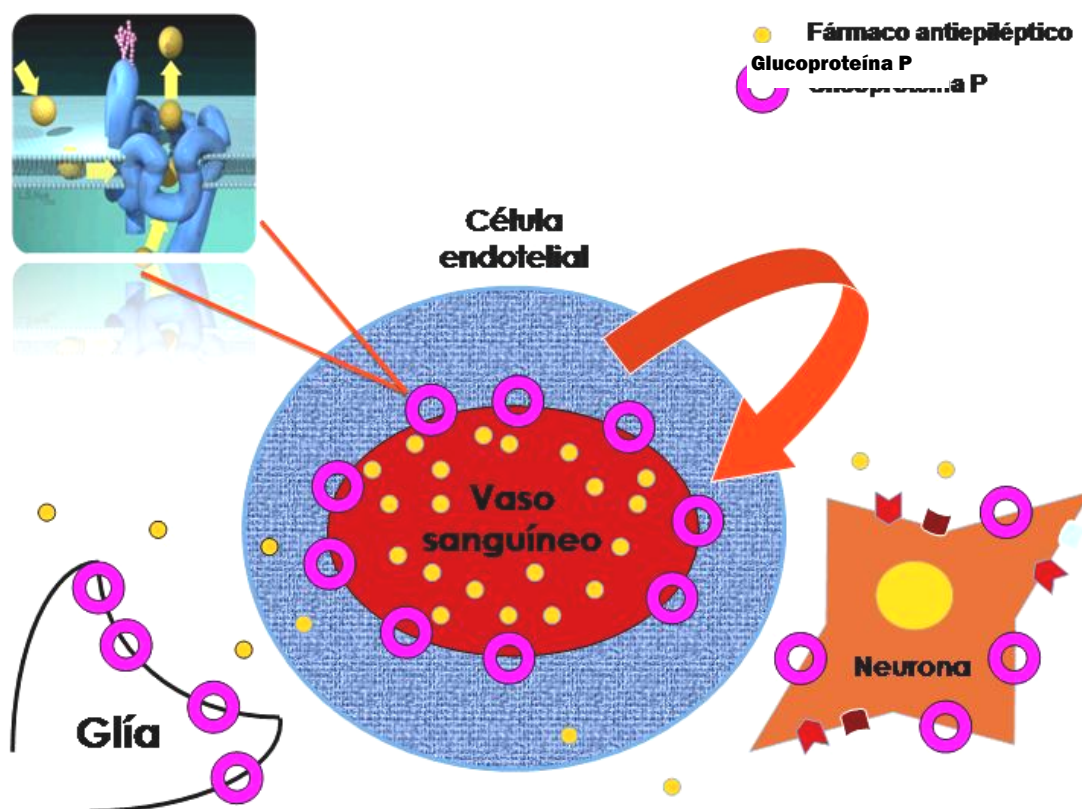


Figura 1. La sobre-expresión de la glucoproteína-P en el endotelio vascular cerebral se asocia a una remoción importante de los fármacos antiepilépticos del espacio extracelular al torrente sanguíneo y una baja exposición de los mismos en su sitio de acción. La glucoproteína-P también se sobre-expresa en la células gliales y neuronales de cerebros de sujetos con epilepsia farmacorresistente.

Sin bien es cierto existen varios modelos de epilepsia, es importante saber identificar a los animales farmacorresistentes para poder caracterizar en ellos los factores asociados a la refractoriedad y aplicar posibles estrategias terapéuticas para su control. A continuación se describen algunos procedimientos experimentales para identificar a un animal con epilepsia farmacorresistente.

“KINDLING” ELÉCTRICO Y FARMACORRESISTENCIA

El modelo de ELT farmacorresistente a la fenitoína utilizando el “*kindling*” eléctrico fue descrito por Löscher y col., en 1993 (24). Se utilizan ratas con un peso entre 250 y 300 g al inicio del estudio. Los animales se someten a cirugía estereotáxica para implantar un electrodo bipolar de acero inoxidable en la amígdala cerebral de acuerdo a las siguientes coordenadas: anteroposterior, 2.2 mm; lateral, 4.8 mm y ventral, 8.5 mm, con respecto al bregma (27). El electrodo se conecta a un conector de tipo amfenol y se fija al cráneo con acrílico dental y tornillos. Los animales se mantienen en un período de recuperación postquirúrgico antes de ser sometidos a cualquier manipulación subsecuente.

Posteriormente, a cada rata se le determina su umbral de post-descarga (UPD) pre-“*kindling*”. Para esto, a los animales se le aplica un estímulo inicial de 10 μA durante un segundo; se le deja descansar durante un minuto y se aplica un nuevo estímulo eléctrico pero con incremento de la intensidad de corriente de un 20%. El procedimiento se repite hasta alcanzar el valor umbral, es decir, la corriente eléctrica mínima necesaria para producir una respuesta conductual y una post-descarga de al menos 3 segundos de duración. Veinticuatro horas después de haber determinado el UPD pre-“*kindling*”, se inicia la estimulación eléctrica tipo “*kindling*”. Esta estimulación consiste en la aplicación diaria en el hipocampo ventral, de un tren de pulsos cuadrados de 1 ms de duración a una frecuencia de 60 Hz y durante 1 s, a una intensidad de corriente de 400 μA (Figura 2). Los cambios conductuales asociados al desarrollo del “*kindling*” eléctrico en la rata se determinan de acuerdo a la escala descrita por Racine en 1972 (30): Fase I, movimientos faciales; Fase II, conductas de la fase I y movimientos de cabeza; Fase III, conductas de la fase II y clonus de miembros anteriores; Fase IV, conductas de la fase III y posición de canguro; Fase V, conductas de la fase IV y pérdida del tono postural. Finalmente, se

considera que un animal es epiléptico cuando alcanza el estado “*kindled*”, es decir, cuando el animal presenta 5 fases V consecutivas.

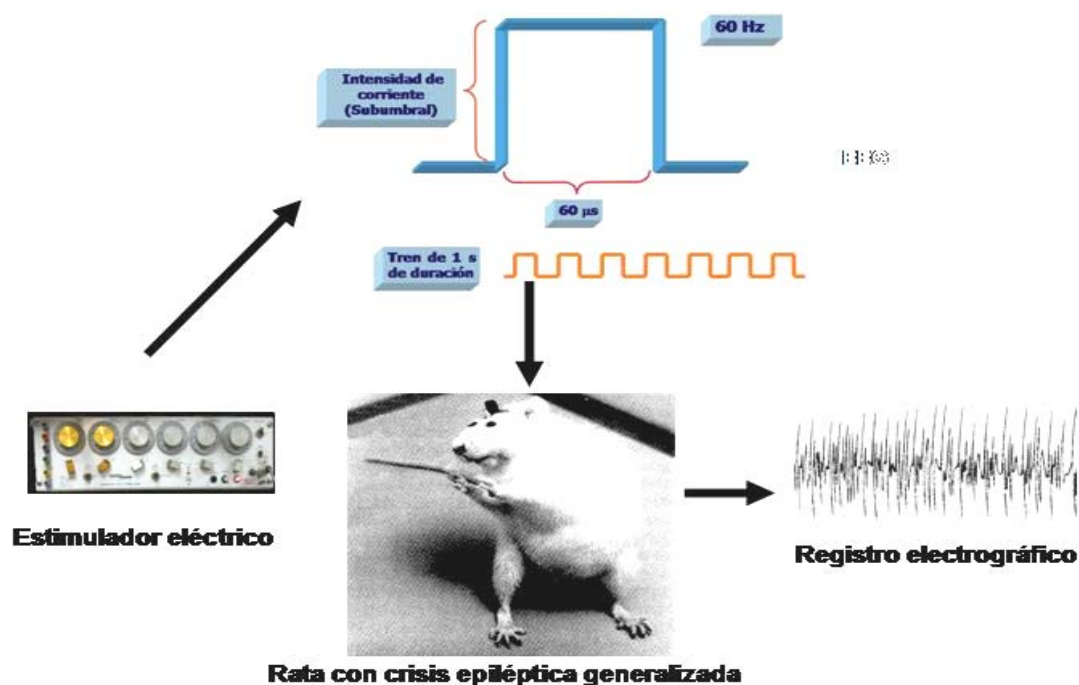


Figura 2. El modelo “*kindling*” se induce por medio de la aplicación repetida de estímulos eléctricos inicialmente subumbrales durante 1 s en áreas susceptibles como la amígdala cerebral o el hipocampo. Dicha estimulación produce cambios electrográficos y conductuales que culminan con la presentación de crisis convulsivas generalizadas.

Veinticuatro horas después de adquirir el estado “*kindled*”, a cada animal se le administra solución salina (1 ml/kg, i.p.) y una hora después se les determina el UPD; 48 horas después se repite la misma acción y así sucesivamente hasta que el animal presenta 3 valores consecutivos de UPD estables. Dos días después de la última determinación con solución salina, se determina nuevamente el UPD 1 h después de la administración de fenitoína (75 mg/kg; i.p.). La determinación del UPD bajo los efectos de la fenitoína se repite una vez cada 5 días hasta que el animal presenta 3 valores consecutivos de UPD similares entre sí (Figura 3). Con base en los resultados obtenidos bajo el efecto de la droga antiepiléptica se clasifican a los animales en responsivos (aquellos que presentaron un incremento del UPD), resistentes (aquellos en los que el UPD no se modificó), así como variables (animales en los que nunca se estabilizó el valor UPD) (24) (Figura 4).

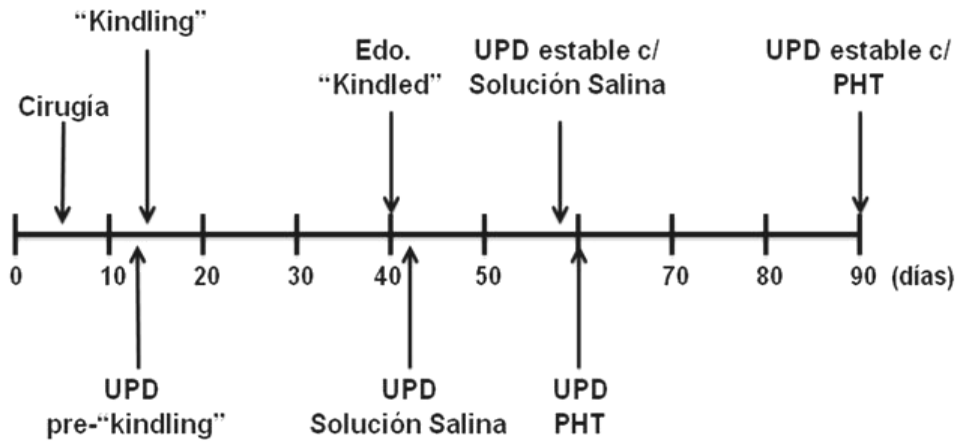


Figura 3. Protocolo experimental para la identificación de animales con epilepsia farmacorresistente a fenitoína (PHT) secundaria al desarrollo del "kindling" eléctrico amigdalino.

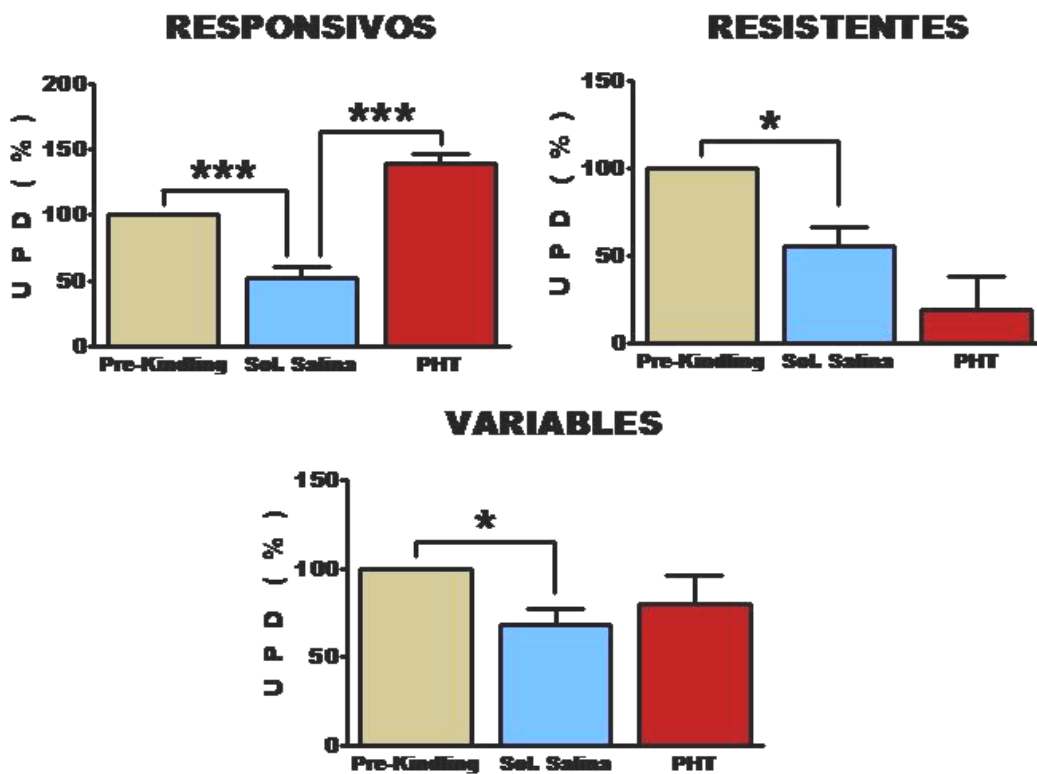


Figura 4. Identificación de los animales responsivos, resistentes y variables al efecto de la fenitoína (PHT) con base en la intensidad de corriente necesaria para inducir un cambio electrográfico y/o conductual (umbral de post-descarga, UPD). Los valores se expresan como promedio del porcentaje de cambio con respecto al valor UPD control. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

ESTATUS EPILÉPTICO Y FARMACORRESISTENCIA

Los modelos de farmacorresistencia en animales con crisis espontáneas son útiles debido a que se asemejan de manera importante a las condiciones que se observan en pacientes con epilepsia farmacorresistente. Al respecto, la inducción de crisis espontáneas que resultan del estatus epiléptico se ha utilizado como un modelo para identificar animales con epilepsia farmacorresistente (8).

Un medio para inducir estatus epiléptico es a través de la estimulación eléctrica del núcleo basolateral de la amígdala cerebral. Para esto, se utilizan ratas, las cuales se someten a cirugía estereotáxica para implantar un electrodo bipolar en el núcleo de la amígdala basolateral de acuerdo a las coordenadas previamente descritas para el “*kindling*” amigdalino. Después de un periodo de recuperación, los animales se someten a la estimulación eléctrica cerebral con los siguientes parámetros: durante 25 min se aplican estímulos eléctricos que consisten en trenes de 100 ms de duración compuestos por pulsos cuadrados bifásicos de 1 ms cada uno, a una frecuencia de 50 Hz y con intensidad de corriente de 700 μ A. Los trenes se dan a una frecuencia de 2/s. Esta estimulación eléctrica induce estatus epiléptico, i.e., crisis convulsivas repetidas, las cuales deben de ser interrumpidas a las 4 h de su inicio con la administración repetida de diazepam (10 mg/kg i.p.).

Otra forma de inducir estatus epiléptico es por medio de la administración repetida de pilocarpina (10 mg/kg, i.p) cada 30 minutos en animales pretratados 24 h antes con litio (3 meq/kg o 127 mg/kg i.p). El estatus epiléptico debe interrumpirse con diazepam (10 mg/kg, i.p) de 60 a 120 min después de haberse iniciado.

Con ambos modelos, los animales presentan crisis epilépticas espontáneas entre 3 y 4 semanas después de haber presentado el estatus epiléptico y se determinan con un registro video-electroencefalográfico (EEG). Con el propósito de identificar a los animales con crisis epilépticas farmacorresistentes, se realiza un registro de la frecuencia de crisis convulsivas espontáneas durante los siguientes periodos: a) Periodo pre-fármaco, i.e., durante 2 semanas antes del tratamiento farmacológico antiepiléptico; b) Periodo de tratamiento durante el cual se administra un fármaco antiepiléptico de elección el cual puede ser el fenobarbital i.p. a una dosis inicial de 25 mg/kg i.p., seguida 10 h después de una segunda dosis de 15 mg/kg i.p. Posteriormente se administra el fenobarbital dos veces al día a la dosis de 15 mg/kg

i.p., por 13 días consecutivos; c) Periodo post-fármaco, que comprende 2 semanas posteriores e inmediatas al tratamiento farmacológico (Figura 5). Con base en la respuesta al tratamiento con fenobarbital, los animales se clasifican en responsivos y no-responsivos. Los animales responsivos son aquellos en los que se suprimen por completo o se reducen a un 75% las crisis convulsivas espontáneas durante el tratamiento farmacológico, los no responsivos son aquellos que no muestran cambios significativos en la incidencia de convulsiones, mientras que los variables no muestran una tendencia clara (9).

Los modelos de estatus epiléptico antes descritos pueden utilizarse para identificar animales epilépticos resistentes a fármacos específicos, como es el caso del levetiracetam, el cual debe de ser administrado por vía subcutánea y de manera continua por medio de minibombas osmóticas durante el periodo de tratamiento farmacológico antiepiléptico (16).

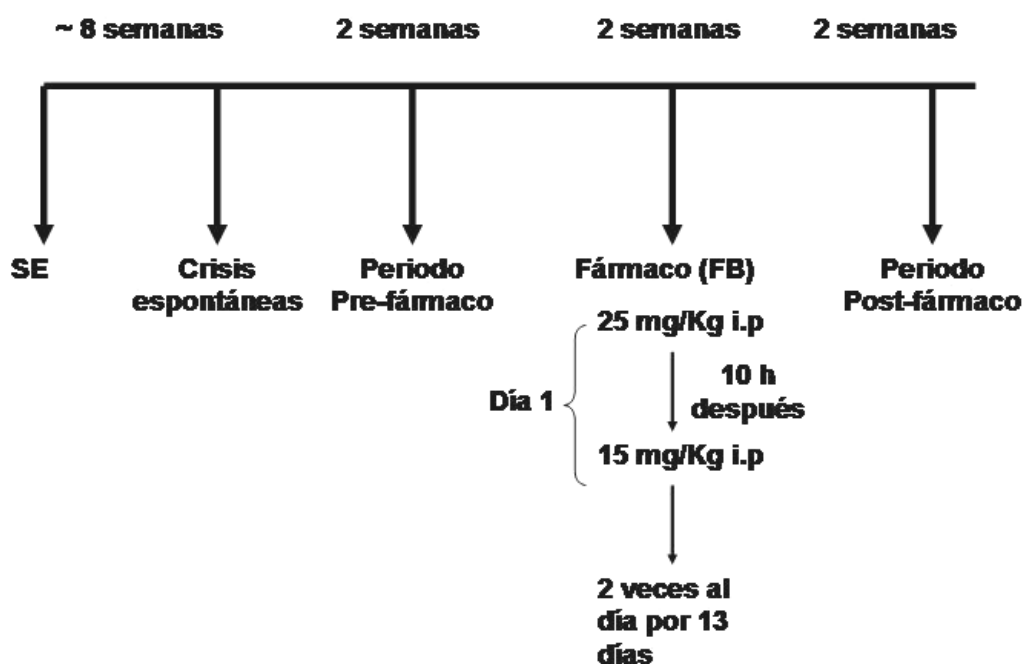


Figura 5. Protocolo experimental para la identificación de animales con crisis epilépticas espontáneas y farmacorresistentes a fenobarbital (FB) secundarias al desarrollo de estatus epiléptico.

ÁCIDO MERCAPTOPROPIÓNICO Y FARMACORRESISTENCIA

El modelo del ácido 3-mercaptopropiónico (3-MP) consiste en la administración repetida de esta sustancia, lo cual resulta en la producción de crisis convulsivas refractorias a algunos fármacos antiepilépticos como la fenitoína (15, 17, 18).

El 3-MP es un compuesto organosulfurado que debe su nombre al grupo -SH que se encuentra en su estructura química, y es capaz de inducir crisis convulsivas a través de la inhibición de la síntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA) (14, 22). Para su preparación, requiere ser disuelto en solución salina y neutralizar su pH final utilizando trizma base (14).

Para este modelo se utilizan ratas adultas, las cuales deben de ser habituadas con la administración diaria de solución salina (1 ml/kg, i.p.) durante una semana previa a la fase experimental. Posteriormente, se le administra el 3-MP (35 mg/kg i.p.) y evalúan los cambios conductuales producidos. Inicialmente los animales presentan guiño, masticación y mioclonias. De 5 a 8 min después del 3-MP se producen crisis convulsivas que se caracterizan por una súbita excitación del animal por unos 10 a 15 segundos, caen al piso emitiendo un chillido y presentan crisis convulsiva generalizada. Las ratas tardan en recuperarse aproximadamente 40 minutos, después de lo cual presenta actividad normal. La repetición diaria de este procedimiento durante 7 a 10 días induce crisis convulsivas refractorias al tratamiento farmacológico, asociado a un aumento en la expresión de la gp-P a nivel de las células endoteliales de los capilares cerebrales de la barrera hematoencefálica, así como a nivel astrocítico y neuronal (22) (Figura 6).

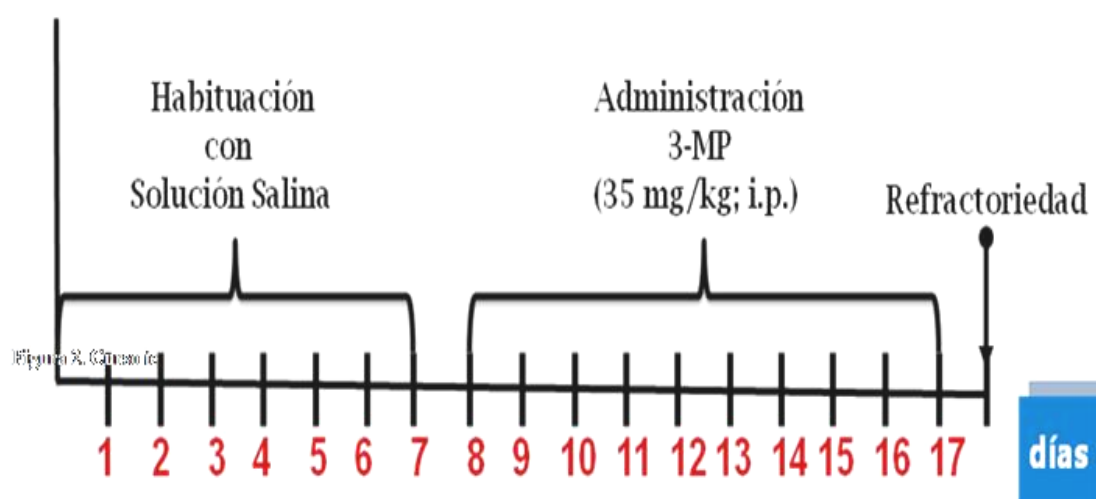


Figura 6. Protocolo experimental para la identificación de animales con crisis epilépticas farmacoresistentes secundarias a la administración repetida de ácido 3-mercaptopropiónico (3-MP).

USO DE TEJIDO HUMANO COMO HERRAMIENTA PARA INVESTIGAR LOS MECANISMOS DE FARMACORRESISTENCIA EN LA EPILEPSIA

Un procedimiento que puede estar asociado a la farmacorresistencia es el uso inadecuado de sustancias que aumentan de manera crónica la neurotransmisión inhibitoria tal como la mediada por el GABA. Al respecto, existen evidencias que indican que la administración repetida de agonistas GABAérgicos puede inducir efectos secundarios indeseables (13), y que, bajo condiciones específicas, puede empeorar la incidencia de crisis convulsivas en el cerebro epiléptico (28), facilitar su producción en el cerebro normal (32), inducir cambios en los receptores GABA_A (10, 38), así como fenómenos de tolerancia y dependencia, especialmente a los efectos de sedación y anticonvulsivantes inducidos por drogas como las benzodiazepinas (BDZ) (7).

Se sabe que la exposición crónica de un agonista produce un proceso de adaptación que puede asociarse a una regulación a la baja de receptores o su fosforilación, con un decremento subsecuente en la respuesta del sistema involucrado (2). Estos mecanismos pueden explicar el decremento de receptores inhibitorios que se observan en el cerebro de pacientes epilépticos que han recibido por años la administración de drogas antiepilépticas por años. También se sugiere que los fármacos antiepilépticos inducen mutaciones que resultan en alteraciones en el acoplamiento de subunidades a sus receptores, reduciendo el efecto de agonistas como las BDZ, aumentando la excitabilidad neuronal (20, 36). Al respecto, es posible que la exposición crónica de drogas antiepilépticas resulte en un decremento en la efectividad de las mismas, un fenómeno que puede estar relacionado con los mecanismos de farmacorresistencia en la epilepsia (1, 19, 25).

El uso de tejido cerebral obtenido de pacientes representa una excelente oportunidad para investigar los mecanismos asociados a la farmacorresistencia. El método de elección para evaluar cambios en receptores depende del objetivo del estudio. La Tomografía de Emisión de Positrones (PET por sus siglas en inglés) se utiliza para evaluar la distribución, densidad y actividad de los receptores *in vivo*. Este procedimiento presenta la desventaja de que es imposible evitar la presencia de ligandos endógenos, por lo que los resultados que se obtengan deben de interpretarse con cautela. El procedimiento de autorradiografía tradicional

representa una estrategia *in vitro* para evaluar la distribución y densidad de receptores en áreas cerebrales específicas, evitando la presencia de ligandos endógenos. Los ligandos que se utilizan se marcan con isótopos radioactivos y la densidad de los receptores se visualiza a través de imágenes en películas sensibles a la radioactividad (6, 37). Por otra parte, la autorradiografía funcional permite analizar la activación de proteínas G como consecuencia de la activación de receptores acoplados a ellas, lo cual representa el primer paso de señalización transduccional de los receptores metabotrópicos. Esta técnica da información funcional en un contexto anatómico (34).

Utilizando las técnicas de autorradiografía tradicional y funcional existen evidencias que indican una correlación significativa entre la unión a los receptores excitadores a serotonina (5-HT₄ y 5-HT₇) y la duración del tratamiento farmacológico antiepiléptico en pacientes con ELT farmacorresistente y sometidos a cirugía de epilepsia (33). Lo anterior apoya la idea de que la administración prolongada de fármacos antiepilépticos puede ser un mecanismo de farmacorresistencia debido a los cambios en receptores. Sin embargo, estudios futuros deben de llevarse a cabo con el propósito de sustentar esta hipótesis.

Lo antes descrito indica la necesidad del estudio integral de los sistemas de neurotransmisión en el tejido cerebral de pacientes con epilepsia y su correlación con datos clínicos permite sugerir e identificar factores que predispongan a la refractoriedad de la epilepsia. Al respecto, la utilización de tejido cerebral de pacientes sometidos a cirugía, recolectado y congelado inmediatamente después de su resección, resulta una situación favorable para evaluar a sistemas de neurotransmisión ya que permite su preservación en buenas condiciones (Figura 7). Así mismo, la evaluación integral de los sistemas de neurotransmisión en el foco epiléptico, obtenido de pacientes con epilepsia farmacorresistente y sometidos a cirugía, puede facilitar conocer su papel en la epilepsia y las bases neurobiológicas de la alta incidencia de trastornos neuropsicológicos y neuropsiquiátricos asociados a ella. Además puede facilitar la identificación de factores que les predisponen. Estos conocimientos pueden aportar evidencias para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de ambos, la epilepsia farmacorresistente y los trastornos neuropsicológicos y neuropsiquiátricos asociados a ella.

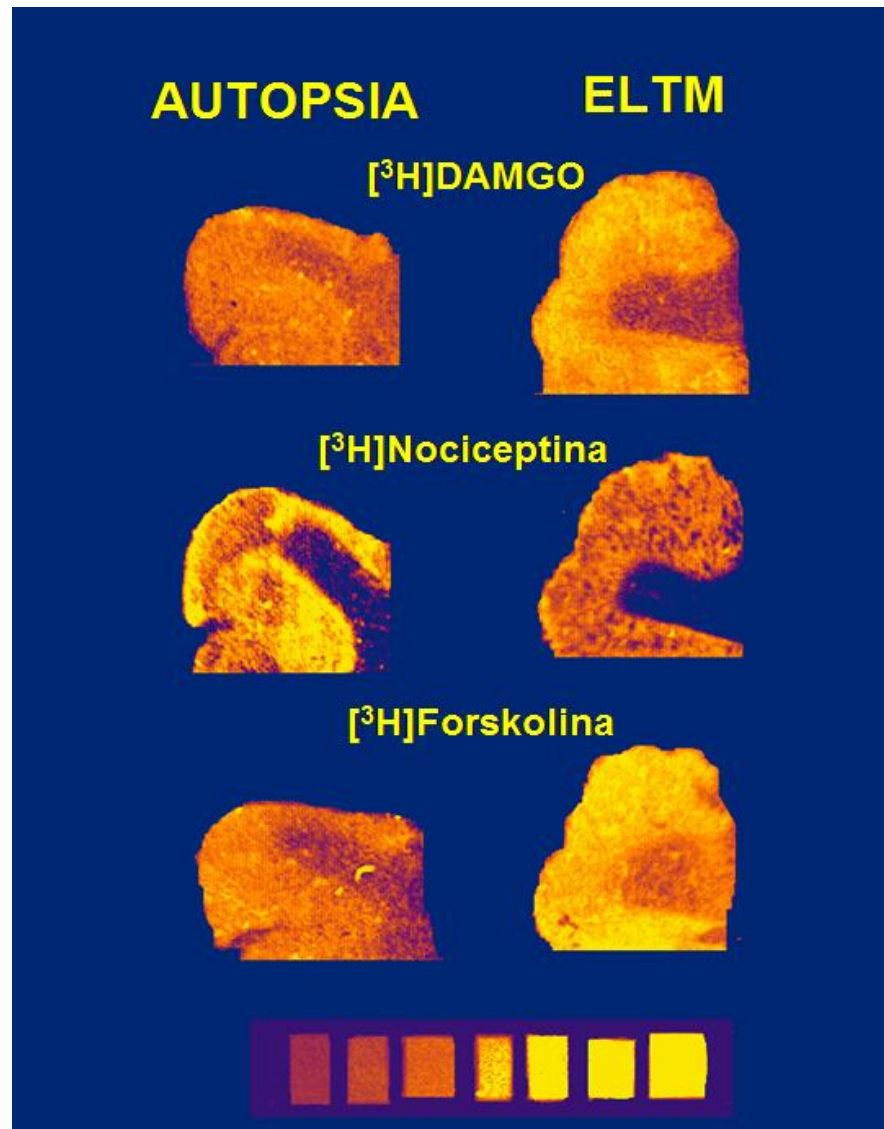


Figura 7. Imágenes de autorradiogramas que se realizaron para analizar la unión a los receptores mu (^3H -DAMGO), a nociceptina (^3H -Nociceptina) y a adenilato ciclasa (^3H -Forskolina) en rebanadas paralelas de tejido cerebral obtenido de una autopsia y de un paciente con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente y sometido a cirugía. El aumento de unión va del amarillo al rojo. Es importante considerar que los pacientes con epilepsia refractaria a medicamento se someten a la resección quirúrgica del área epileptógena como una alternativa terapéutica para mejorar su calidad de vida.

CONCLUSIONES

Si bien es cierto que existen varios modelos de epilepsia, es importante el diseño y conocimiento de estrategias experimentales que permitan identificar a los animales epilépticos farmacorresistentes. Lo anterior requiere de invertir un tiempo de experimentación prolongado y en ocasiones de un alto consumo de animales. Sin

embargo, la información que se obtenga es sumamente valiosa y debe de ser comparada con la presentada por los pacientes con epilepsia farmacorresistente. La utilización adecuada de modelos experimentales que reproduzcan las características de la epilepsia resistente a drogas antiepilépticas permitirá diseñar estrategias terapéuticas para su control.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico de Leticia Neri-Bazán y Héctor Vázquez Espinoza. El presente estudio fue parcialmente apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 98386 y beca de posgrado para H.L.M. 192168).

REFERENCIAS

1. Aicardi J. 1988. Clinical approach to the management of intractable epilepsy. *Dev Med Child Neurol*, 30: 429-440.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. New York; USA: Garland Publishing Inc, pp. 721-785.
3. Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, Redeker S, Özbas-Gercerer F, van Vliet EA, Scheffer GL, Scheper RJ, van der Valk P, Baayen JC and Troost D. 2004. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 45 (5): 441-451.
4. Arroyo S, Brodie MJ, Avanzini G, Baumgartner C, Chiron C, Dulac O, French JA and Serratosa JM. 2002. Is refractory epilepsy preventable? *Epilepsia*, 43: 437-444.
5. Bell GS, Sander JW. 2001. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure*, 10 (4): 306-316.
6. Benn CL, Farrell LA and Cha JH. 2004. Neurotransmitter receptor analysis in transgenic mouse models, Y. Kohwl (ed.), Humana Press, pp. 231.
7. Braestrup C, Nielsen M, Squires RF. 1979. No change in rat benzodiazepine receptors after withdrawal from continuous treatment with lorazepam and diazepam. *Life Sci*, 24: 347-350.
8. Brandt C, Glien M, Potschka H, Volk H, Löscher W. 2003. Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. *Epilepsy Res*, 55 (1-2): 83-103.
9. Brandt C, Volk HA, Löscher W. 2004. Striking differences in individual anticonvulsant response to phenobarbital in rats with spontaneous seizures after status epilepticus. *Epilepsia*, 45 (12): 1488-1497.
10. Calkin PA, Barnes EM. 1994. GABA_A agonists down-regulate GABA_A/benzodiazepine receptor polypeptides from the surface of chick cortical neurons. *J Biol Chem*, 269: 1548-1553.
11. Engel J Jr, 1996. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 26. Pp 141-150.
12. Fisher RS and Frost JJ. 1991. Epilepsy. *J Nucl Med*, 32 (4): 651-659.
13. Gale K. 1992. GABA and epilepsy: basic concepts from preclinical research. *Epilepsia*, 33 (Suppl 5): S3-S12.
14. Giraldez L, Zanetti F y Girardi E. 1999. Striatum adenosine A₂ receptors are modified during seizure: effect of cyclopentyladenosine administration. *Neurochem. Res.* 24(10): 1217-1223.
15. Girardi E, González NN y Lazarowski A. 2005. Refractory phenotype reversion by nimodipine administration in a model of epilepsy resistant to phenytoin treatment. *Epilepsia* 46 (S6): 212.
16. Glien M, Brandt C, Potschka H, Löscher W. 2002. Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 43 (4): 350-357.

17. Höcht C, Lazarowski A, Gonzalez NN, Auzmendi J, Opezzo JAW, Bramuglia GF, Taira CA y Girardi E. 2007. Nimodipine restores the altered hippocampal phenytoin pharmacokinetics in a refractory epileptic model. *Neurosci Letters* 413: 168-172.
18. Höcht C, Lazarowski A, Gonzalez NN, Mayer MA, Opezzo JAW, Taira CA y Girardi E. 2009. Differential hippocampal pharmacokinetics of phenobarbital and carbamazepine in repetitive seizures induced by 3-mercaptopropionic acid. *Neurosci. Letters* 453: 54-57.
19. Jallon P. 1997. The problem of intractability: the continuing need for new medical therapies in epilepsy. *Epilepsia*, 38 (Suppl 9): S37-S42.
20. Kralic JE, O'Buckley TK, Khisti RT, Hodge CW, Homanics GE, Morrow AL. 2002. GABA (A) receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacology*, 43: 685-94.
21. Kwan P and Brodie MJ. 2005. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 46 (2): 224-235.
22. Lazarowski A, Ramos AJ, García-Rivello H, Brusco A y Girardi E. 2004. Neuronal and glial expression of the multidrug resistance gene product in an experimental epilepsy model. *Cellular and Molecular Neurobiol*, 24 (1): 77-85.
23. Löscher W and Potschka H. 2005. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews* 6: 591-602.
24. Löscher W, Rundfeldt C y Hönack D. 1993. Pharmacological characterization of phenytoin-resistant amygdale-kindled rats, a new model of drug-resistant partial epilepsy. *Epilepsy Res*, 15: 207-219.
25. Loscher W. 1997. Animal models of intractable epilepsy. *Progress in Neurobiology*, 53: 239-258.
26. McNamara JO. 1994. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci*, 14: 3413-3425.
27. Paxinos G and Watson C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed. Academic Press, Sydney.
28. Perucca E, Gram L, Avanzini G, Dulac O. 1998. Antiepileptic drugs as a cause of worsening seizures. *Epilepsia*, 39: 5-17.
29. Placencia M. 2007. ¿Qué tan frecuentes son las epilepsias en el mundo? En: *Epilepsias: Todo lo que usted desea saber*. Acevedo C, Campos M, Mesa T y Núñez L. 2ª ed. BHA Impresores. Santiago, Chile. Pp 37-46.
30. Racine RJ. 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32: 281-294.
31. Regesta G and Tanganelli P. 1997. Biological basis of refractory epilepsies. En: *Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs*. John Libbey & Company Ltd.
32. Rocha L. 2008. Subchronic treatment with antiepileptic drugs modifies pentylentetrazol-induced seizures in mice: its correlation with benzodiazepine receptor binding. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4: 619-625.
33. Rocha L, Lorigados-Pedre L, Orozco-Suárez S, Morales-Chacón L, Alonso-Vanegas M, García-Maeso I, Estupiñán B, Villeda-Hernández J, Osorio-Rico L and Quintana C. 2007. Autoradiography reveals selective changes in serotonin binding in neocortex of patients with temporal lobe epilepsy. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psich*, 31: 1208-1218.
34. Sóvágó J, Dupuis DS, Gulyás B and Hall H. 2001. An overview on functional receptor autoradiography using [35S] GTP gamma S. *Brain Res Brain Res Rev*, 38 (1-2): 149-164.
35. Volk HA and Löscher W. 2005. Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain*, 128: 1358-1368.
36. Wu J, Ellsworth K, Ellsworth M, Schroeder KM, Smith K, Fisher RS. 2004. Abnormal benzodiazepine and zinc modulation of GABA_A receptors in an acquired absence epilepsy model. *Brain Res*, 1013: 230-240.
37. Yonekawa WD, Kupferberg HJ and Woodbury DM. 1980. Relationship between pentylentetrazol-induced seizures and brain pentylentetrazol levels in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 214 (3): 589-593.
38. Yu R, Ticku MK. 1995. Chronic neurosteroid treatment produces functional heterologous uncoupling at the GABA_A/benzodiazepine receptor complex in mammalian cortical neurons. *Mol Pharmacol*, 47: 603-610.

LA FARMACOGENÓMICA EN LA EPILEPSIA REFRACTARIA AL TRATAMIENTO

Feria-Romero IA, Escalante-Santiago D, López-García MA, Orozco-Suárez S.

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades,
CMN Siglo XXI, IMSS, México, D.F., México.

RESUMEN

La farmacogenómica es un área de la genética que pretende personalizar el tipo y cantidad del medicamento que se debe administrar a cada individuo dependiendo de su perfil genético y su padecimiento. El interés por esta rama surgió principalmente por los efectos adversos y la resistencia a fármacos que presentan los individuos. En la epilepsia, los estudios genéticos se han enfocado en genes que tienen una relación lógica con este padecimiento, como son los sistemas inhibidores y excitadores, su relación con diferentes síndromes de difícil control farmacológico, y el tipo o tipos de antiepilépticos (DAEs) que se administran. De manera complementaria, el estudio genético de la farmacoresistencia se ha enfocado en genes que históricamente tienen trascendencia en la resistencia a fármacos como es la familia de los citocromos 450 (CYP) y las proteínas transportadoras de multi-fármacos (MDR y MRP). A pesar de todos los estudios realizados, hasta el momento no se ha determinado el gen o grupos de genes que demuestren una asociación directa entre la variabilidad genética y la epilepsia farmacorresistente. Lo anterior sugiere que para una mejor selección en el fenotipo del individuo y el tipo de epilepsia que padece, es necesario incrementar significativamente, el número de pacientes y extender el grupo de genes que se van a estudiar, si es que se desea continuar en esta búsqueda. En el presente capítulo los autores revisan las bases moleculares que originan las teorías farmacogenética y farmacodinámica, así como

su relación con la resistencia a los medicamentos, enfocándose principalmente a la epilepsia.

INTRODUCCIÓN

Los medicamentos utilizados en el tratamiento de diferentes padecimientos, paradójicamente son identificados como una de las principales causas dentro de los efectos adversos que dan lugar a la morbilidad y mortalidad del paciente, así como a un costo excesivo en sus cuidados médicos, siendo tema de gran interés para el sector salud (46). Al respecto, Lazarou y colaboradores (36), publicaron un metanálisis donde se estimó que más de 2 millones de pacientes son hospitalizados anualmente por reacciones adversas a los medicamentos, a pesar de que estos son prescritos y administrados adecuadamente, ubicándose a ésta entre la sexta y cuarta causa de mortalidad en los Estados Unidos de América en 1994. Esta noticia causó el asombro y preocupación de las autoridades para buscar una solución ante tal problema.

Entre las soluciones que se plantearon, fue explorar el estudio de las variaciones genéticas entre los individuos y su asociación con el metabolismo de los medicamentos. Para ello se integró en conocimiento del Proyecto del Genoma Humano, el cual ha proporcionado información genética valiosa que seguramente, permitirá en un futuro una terapia individualizada, hoy conocida como farmacogenómica (13). La farmacogenómica es un término que fusiona los conceptos de farmacología y genómica, ya que combina el conocimiento bioquímico de los genes específicos, sus polimorfismos y proteínas que tienen relación con el metabolismo de los fármacos, y así asociarlos con el tipo de droga que requiere cada individuo según sus características genéticas. Es cierto que el medio ambiente, la dieta, edad, estilo de vida y estado de salud en el que se encuentra cada persona puede influir en su respuesta a los medicamentos, pero conocer mejor la genética del individuo será la clave para la creación de drogas personalizadas más eficaces y seguras.

Los principales beneficios que se buscan al identificar el medicamento adecuado, son: a) eliminar el método de ensayo-error; b) acelerar el tiempo de recuperación y aumentar la seguridad terapéutica al eliminar las reacciones adversas; y c) sustituir

los métodos convencionales de dosificación del medicamento de talla y peso por la forma y tiempo en que el individuo lo metaboliza, disminuyendo el riesgo de una sobredosis (14,10).

TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA EPILEPSIA

La epilepsia es la presentación crónica y recurrente de fenómenos paroxísticos por descargas eléctricas anormales en el cerebro (crisis epilépticas), con una manifestación clínica variada y causas muy diversas (52). Las crisis en conjunto pueden ser convulsivas o no convulsivas y se definen como el resultado de una descarga neuronal excesiva que es hipersincrónica y autolimitada, que ha tratado de explicar a través de modelos experimentales que semejan diferentes tipos de epilepsias humanas (18). Estos modelos sugieren que la epilepsia se origina en neuronas del hipocampo y corteza cerebral por su capacidad de producir descargas intrínsecas, estas descargas pueden ser secundarias a una falla en el mecanismo inhibidor GABAérgico (GABA, ácido gamma-amino-butírico) o al exceso de estímulos excitadores mediados por glutamato y aspartato, o bien por cambios intra o extracelulares en los iones de sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}), que pueden favorecer la generación de crisis epilépticas.

Este padecimiento afecta del 1 al 2% de la población mundial, y en México, su prevalencia oscila entre el 1.8 y 2% de la población general, lo que representa más de un millón de pacientes con este padecimiento (9, 48). El tratamiento adecuado para el control de las crisis epilépticas, es la administración de fármacos antiepilépticos (DAEs), y su elección depende del tipo de crisis, tolerabilidad y seguridad (9). Actualmente se usan en la clínica tres generaciones de DAEs, la primera incluye al: fenobarbital, difenildantoína o fenitoína, benzodiazepinas y etoxusimida; en la segunda generación se agrupa a: la carbamazepina y el valproato; y en la tercera generación se encuentran: la vigabatrina, gabapentina, felbamato, lamotrigina, topiramato, fosfenitoína, tiagabina, levetiracetam, zonisamida y oxcarbazepina (5). La Tabla 1 resume algunas características importantes que se utilizan en la clínica para la utilización de los DAEs más comunes.

Tabla 1. Aspectos clínicos sobresalientes de los antiepilépticos de primera y segunda generación.

Nombre	Vía de administración	Unión a proteínas plasmáticas (%)	Concentración terapéutica plasmática	Mecanismo de acción	Control de crisis
Fenobarbital	VO	40- 50	15 - 35 mg/ml	Reduce glutamato y aumenta GABA	Tónico-clónicas generalizadas y parciales
Difenildantoína o fenitoína	VO, IM y VI	80 - 90	10 - 20 mg/ml	Probable inhibición de canales de Na ⁺	Todas excepto de ausencia
Benzodiazepinas	IV	----	5 - 70 ng/ml (clonazepam)	Aumento de la conducción de K ⁺ y acumulación de adenosina	Tónico-clónicas generalizadas (lorazepam) Ausencia, mioclónicas (clonazepam)
Carbamazepina	VO	70 - 80	6 - 12 mg/ml	Probable inhibición de canales de Na ⁺	Tónico-clónicas generalizadas
Valproato	VO y VI	85 - 94	30 - 100 mg/ml	Probable inhibición de canales de Na ⁺ , aumento de GABA	Tónico-clónicas generalizadas, ausencia, mioclónicas
Lamotrigina	VO	55	2-20 mg/l	Bloqueo de los canales de sodio dependientes del voltaje. Inhibe la liberación patológica del glutamato	Epilepsias parciales con o sin generalización secundaria a tónico-clónicas
Topiramato	VO	13 - 17	2-25 mg/l	Bloqueo de los canales de sodio. Facilita la acción del GABA. Antagonista débil del receptor AMPA/kainato del glutamato	En epilepsias de diagnóstico reciente (monoterapia) y en epilepsias parciales complejas (concomitante)
Levetiracetam	VO	< 10	31-43 µg/ml	Disminuye los niveles de Ca ²⁺ al interior de la neurona. Aumenta las corrientes dependientes de GABA y glicina. Controla la Exocitosis de neurotransmisores	Epilepsias parciales con sintomatología compleja o simple
Oxcarbazepina	VO	40	34 µmol/l	Bloquea canales de sodio activados por voltaje. Aumenta la conductancia del potasio y modula los canales de calcio activados por un alto voltaje	Epilepsias parciales con o sin generalización secundaria y crisis tónico-clónicas

Al igual que otros medicamentos, los DAEs presentan efectos secundarios que pueden variar dependiendo de la susceptibilidad del individuo al medicamento debido a diversas circunstancias fisiológicas, metabólicas o genéticas (30).

EFFECTOS SECUNDARIOS DE LAS DAEs

Efecto teratogénico

Valproato, fenobarbital, fenitoína y carbamazepina, así como su uso en politerapia, incrementan significativamente el riesgo de producir malformaciones congénitas en mujeres embarazadas a nivel del tubo neural, defectos cardiacos, hendiduras orofaciales, defectos urológicos y anomalías en la estructura ósea, acompañadas de la posibilidad de un retraso en el neurodesarrollo. Hasta el momento no se ha demostrado concretamente el alelo de alguna proteína conocida que se asocie con la susceptibilidad teratogénica de alguno de estos DAEs, aunque se ha explorado la asociación entre el valproato y el polimorfismo 677C>T del gen *MTHFR* sin encontrar resultados significativos (67, 31).

Reacciones de hipersensibilidad

El síndrome de Stevens-Johnson y la necrólisis epidermal tóxica son las reacciones adversas cutáneas más comunes debidas a la carbamazepina, fenitoína y lamotrigina, con una incidencia de 1:10,000 por exposición a estos DAEs y una mortalidad mayor del 30%. La mayor asociación identificada hasta el momento con el síndrome Stevens-Johnson es entre el alelo *HLA-B*1502* y la carbamazepina en población asiática o de descendencia asiática. Por el contrario, la formación de erupciones cutáneas que se presenta en un 10–16% de los pacientes no se ha detectado algún componente genético predictivo (12).

Hepatotoxicidad

El daño hepático que causan los DAEs se atribuye a mecanismos mediados por el sistema inmunológico o un daño citotóxico directo con una incidencia de 1:20,000 o de 1:6,000 en población infantil menor a 2 años que es tratada con politerapia. El valproato tiene una acción tóxica directa y la susceptibilidad se puede elevar por una alteración en el metabolismo del valproato. Los polimorfismos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* que causan una deficiencia en la glutatión S-transferasa tienen una asociación

con una toxicidad media pero no severa. Por otro lado, las enfermedades mitocondriales son un factor de riesgo para la hepatotoxicidad por valproato (7, 23).

Problemas visuales

La vigabatrina, un inhibidor de la enzima GABA-transaminasa produce una disminución irreversible del campo concéntrico visual bilateral en aproximadamente el 40% de pacientes epilépticos que la consume, de igual forma la tiagabina también tiene efecto sobre el campo visual. El topiramato incrementa la transmisión GABAérgica se ha asociado con un glaucoma agudo de ángulo cerrado. La carbamazepina se asocia con una percepción anormal del color y una reducción en el contraste (27).

Ostopenia y osteoporosis

Los pacientes epilépticos presentan riesgo de sufrir algún tipo de fractura, aunque no se presenta en toda la población. Por ello, aún resulta controversial tratar de explicar el mecanismo. Algunos DAEs como la fenitoína o fenobarbital reducen la concentración de calcio y elevan la hormona paratiroidea por la inducción de enzimas hepáticas y alteran el metabolismo de la vitamina D, sin embargo hay pacientes que desarrollan ostopenia y osteoporosis a pesar de que no utilizan este tipo de antiepilépticos. La carbamazepina y el valproato también pueden afectar la salud del sistema óseo, sin embargo, no se tienen suficientes estudios a este respecto (44). Hasta el momento no se tienen reportados estudios que asocien la predisposición genética de los pacientes que consumen antiepilépticos y el desarrollo de estas enfermedades.

Alteración en el peso

El topiramato, zonisamida y felbamato se asocian con la pérdida de peso; el ácido valpróico, gabapentina, pregabalina y vigabatrina se asocian con la ganancia de peso; en cambio con la lamotrigina, levetiracetam y fenitoína no se observan cambios en el peso del paciente. Uno de los DAEs más estudiados es el ácido valpróico, en una revisión reciente los autores discuten que anomalías metabólicas y endocrinológicas más frecuentes en los pacientes es la hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, la hiperleptinemia y resistencia a la leptina, así como un incremento en la disponibilidad de ácidos grasos libres de cadena larga (69). Con respecto a los factores genéticos, un estudio realizado en gemelos monozigotos

sugiere la participación de componentes hereditarios y propone la identificación de genes relevantes (32).

Hiperhomocisteinemia

El valproato, carbamazepina, fenitoína y fenobarbital pueden producir hiperhomocisteinemia al alterar los niveles de folato y vitamina B12, que son necesarios para la metilación de la homocisteína a metionina. Esta alteración es un factor de riesgo en enfermedades vasculares y genéticamente se sugiere una relación con los polimorfismos 677C>T y/o 1298A>C del gen MTHFR (31).

Alteraciones cognitivas y de comportamiento

El topiramato y levetiracetam particularmente tienen una asociación con experiencias psiquiátricas y alteración en el comportamiento. El topiramato presenta alteraciones cognitivas en dificultad del lenguaje, lento entendimiento, problemas de memoria y somnolencia (45). Hasta el momento no existen estudios farmacogenéticos que identifiquen la susceptibilidad entre los medicamentos y estos efectos adversos.

NEUROGENÉTICA DE LA EPILEPSIA

Las bases genéticas en el conocimiento de diferentes síndromes epilépticos son muy recientes a pesar del carácter hereditario de la epilepsia (Tabla 2), los síndromes más representativos en el estudio de la neurogenética (39) son los siguientes:

I. El grupo de *epilepsias generalizadas con crisis febriles plus* (GEFS+) que afecta aproximadamente al 3% de la población infantil dentro de sus primeros 6 años de vida siendo el desorden convulsivo más común, aunque una pequeña proporción de esta población continúa con las crisis sin la presencia de fiebre. Este comportamiento sugiere un componente hereditario complejo, pero son raras las familias que presentan una herencia autosómica dominante. Los loci FEB1 y FEB2 localizados en los cromosomas 8q en 19p respectivamente, se relacionan con convulsiones febriles del tipo familiar (54).

II. La *epilepsia juvenil mioclónica* se caracteriza por movimientos mioclónicos durante la mañana y crisis tónico-clónicas generalizadas en la adolescencia, también presenta susceptibilidad con la ingesta de alcohol o falta de sueño. El electroencefalograma ictal muestra multiespigas y ondas complejas en un voltaje

típico de 4 – 6 Hz, con un comportamiento interictal normal. Este es el síndrome epiléptico de origen genético más estudiado, tiene una herencia autosómica dominante con baja penetrancia y con varios subtipos clínicos. El tratamiento con valproato permite controlar las crisis en la mayoría de estos pacientes (16).

III. La *epilepsia frontal nocturna autosómica dominante* se caracteriza por la presencia de series de crisis (ocho en promedio) de corta duración (menos de un minuto) durante el sueño, las cuales son principalmente de tipo motor (distónico, tónico e hipercinético); y precedidas por aura con sensibilidad anormal (parestesia focal o generalizada), sensorial (alucinaciones auditivas, mareo, vértigo), psicológica (miedo, déjà vu) o autonómicas (taquicardia o dificultad respiratoria) (55).

IV. Las *epilepsias benignas parciales de la infancia* pueden presentarse con paroxismos rolándicos (BERP) u occipitales (BEOP), ambas formas presentan una predisposición familiar clara y un patrón de herencia compleja que permite la identificación de genes involucrados. BERP se caracteriza por crisis nocturnas con hipertonía o movimientos clónicos hemifásicos y a lo largo del brazo, con salivación y sonidos guturales que comienzan en la infancia con evolución benigna hasta desaparecer en la adolescencia. BEOP se caracteriza por crisis motoras precedidas de síntomas visuales y migraña, inicia durante la infancia y tiene un curso benigno hasta desaparecer en la adolescencia (32, 15).

V. La *epilepsia familiar autosómica dominante del lóbulo temporal* (ETL), se caracteriza por la presentación de fenómenos psicológicos (miedo, déjà vu), autonómicos (nausea, taquicardia) o sensitiva (sensación de movimiento, distorsión compleja de imágenes y sonidos) que se acompañan de crisis parciales complejas, algunas veces con automatismos orofaríngeales. Las crisis que comienzan en la adolescencia no son frecuentes y se controlan con medicamento (11). Una variante del ETL es la *epilepsia lateral autosómica dominante del lóbulo temporal* (ADLTE) también nombrada *epilepsia parcial con síntomas auditivos* (ADPEAF), cursa con crisis parciales visuales simples (imágenes), auditivas (zumbido, ruido de máquinas) o afásicas, con frecuencia se presenta una generalización secundaria que se manifiesta con migraña, las crisis se controlan bien con antiepilépticos pero reaparecen cuando se retira el tratamiento. Los síntomas aparecen durante las primeras horas del sueño.

Tabla 2. Bases genéticas de síndromes epilépticos con crisis generalizadas o parciales.

CRISIS	SÍNDROME EPILÉPTICO	SUBTIPO	LOCALIZACIÓN	GEN
GENERALIZADAS	Generalizada con convulsiones febriles plus	GEFS+ 1	19q13.1	SCN1B
		GEFS+ 2	2q24	SCN1A
		GEFS+ 3	5q31.1-33.1	GABRG2
		GEFS+ 4	2p24	
		GEFS+ 5	1p36.3	GABRD
		GEFS+ 6	8p23-p21	
		GEFS+ 7	2q24	SCN9A
	Juvenil mioclónica	EJM1	6p12-p11	EFHC1
		EJM2	15q14	
		EJM3	6p21.3	BRD2
		EJM5	5q34-q35	GABRA1
		EJM6	2q22-23	CACNB4
		EJM7	1p36	GABRD
		EJM8	3q26	CLCN2
	Frontal nocturna autosómica dominante	ADNFE1	20q13.2-q13.3	CHRNA4
		ADNFE2	15q24	CHRNA3-5
		ADNFE3	1q21	CHRN2
		ADNFE4	8p21	CHRNA2
	Epilepsias benignas con convulsiones	EBN1	20q13.3	KCNQ2
		EBN2	8q24	KCNQ3
BFIC1		19q		
BFIC2		16p		
BFIC3		2q23-q24.3	SCN2A	
BFIC4		1p		
PARCIALES	Familiar temporal	ETL	12q22-q23.3	
		ADLTE	10q24	LGI1
	Parcial con área variable		22q11-q12	
	Parcial benigna de la infancia	BERP	15q14	
		BEOP	16p12-11.2	
AUSENCIAS	Ausencias en la infancia	ECA1	8q24	KCNQ3
		ECA2	5q31.1	GABRG2
		ECA3	3q26	
		ECA4	5q34	GABRA1
		ECA5	15q11-q12	GABRB3
		ECA6	16p13	CACNA1H
	Juvenil con ausencias	EJA1	6p12-p11	EFHC1
		EJA2	3q26	CLCN2

VI. La *epilepsia parcial con área variable* es un síndrome familiar con herencia autosómica dominante, de baja penetrancia y expresión muy variable que se caracteriza porque cada miembro de la familia presenta una localización diferente del área epiléptica, aunque cada individuo presenta un solo foco epiléptico. La mayoría de los pacientes presentan crisis de origen frontal o temporal y pocos son los casos de las regiones centroparietal u occipital. Algunos pacientes presentan pocas crisis durante su vida con buena respuesta a los medicamentos, y por el contrario, otros presentan refractariedad y crisis frecuentes (56).

VII. Las *epilepsias benignas con convulsiones en la etapa neonatal (EBN) o infantil (BFIC)*, como su nombre lo indica difieren en la edad de inicio, la primera empieza la primera semana de vida y generalmente desaparece antes de la sexta semana, la segunda aparecen entre el cuarto y doceavo mes; ambas se caracterizan por la presencia de crisis tónico generalizadas o crisis focales de evolución benigna sin alteraciones del desarrollo físico o mental. Las crisis desaparecen a los 2 años de vida y solo 10-15% de los pacientes sufren crisis epilépticas en la edad adulta (6, 21).

VIII. La *epilepsia infantil con crisis de ausencia* se caracterizan por un breve disturbio en la conciencia con un patrón electrofisiológico de 3Hz tipo espiga-onda (20). La variante juvenil es un subtipo idiopático de la epilepsia generalizada que se presenta en la pubertad y se manifiesta con crisis de ausencia, tónico-clónicas generalizadas en estado consiente y mioclónicas.

EPILEPSIA REFRACTARIA AL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Como se comentó anteriormente, el tratamiento farmacológico es utilizado como primera opción para el control de las crisis epilépticas a pesar de los efectos secundarios que se presentan en algunos pacientes. Adicionalmente, una tercera parte de los pacientes con epilepsia no tienen control de las crisis aún cuando se administran diferentes DAEs (53, 49).

La resistencia a fármacos es un importante problema clínico en la epilepsia y todavía persisten debates con respecto al significado de los términos “resistencia a fármacos o fármaco-resistente”, “refractariedad” e “intratable”, la definición de estos términos generalmente se basa en observaciones clínicas y son en cierta medida arbitrarias (63). Por esta razón, la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) define a los pacientes epilépticos farmacorresistentes como aquellos que aún con niveles séricos del fármaco adecuados, fallan en controlar totalmente sus crisis epilépticas con dos tratamientos de fármacos estrictamente seleccionados, ya sea en monoterapia o politerapia (34).

A nivel clínico, los factores que se asocian con la epilepsia fármacorresistente incluyen el inicio temprano de las crisis (antes del primer año de edad), la frecuencia elevada de crisis antes del inicio del tratamiento, la historia de crisis febriles, el tipo

de crisis (cerca del 60% de los pacientes con epilepsia intratable sufren de crisis parciales) o epilepsia, lesiones estructurales cerebrales, malformaciones del desarrollo cortical e inclusive tumores neuroepiteliales desembrionales (60, 49, 65). A nivel celular la epilepsia se asocia con una reorganización anormal de los circuitos neuronales, la alteración en los receptores de diversos neurotransmisores, patologías en los canales iónicos, la autoinmunidad reactiva y/o la penetración alterada de los fármacos antiepilépticos en el foco epiléptico por posibles alteraciones a nivel de la barrera hematoencefálica (BHE) (35, 41). A nivel de factores genéticos, se asocian a los polimorfismos de genes que codifican a receptores, transportadores y/o neurotransmisores involucrados en la fisiopatología de las crisis epilépticas, lo que intenta explicar porque dos pacientes con el mismo tipo de crisis o epilepsia difieren en su respuesta al fármaco.

La primera asociación farmacogenética de la epilepsia se realizó en las enzimas metabolizadoras CYP o el grupo de los citocromos P450, debido a la experiencia con otros padecimientos que presentaban resistencia o intoxicación a los fármacos. Estas enzimas participan en el metabolismo de compuestos tanto exógenos como endógenos. De manera particular las enzimas CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 y CYP2B6 son responsables en un 75% del metabolismo del fármaco en una primera fase, en un 60% se asocian con la excreción del fármaco y un 40% son altamente polimórficas. Con respecto al metabolismo de DAEs, las enzimas que participan en el metabolismo de la carbamazepina son CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6, UGT1A6, UBG2B; del ácido valpróico, CYP2C9, CYP2C19; de la fenitoína CYP2C9, CYP2C19, UGT; tiagabina CYP3A4; topiramato CYP2C9, CYP2C19; felbamato CYP2E1, CYP3A4, CYP2C19 (4). Con respecto a la participación de los polimorfismos y los DAEs, Tate y cols (2005) observaron la asociación del alelo *2 de la enzima CYP2C9 con dosis máximas de fenitoína (66).

Por otro lado, los factores relacionados con los DAEs y su ineficacia en el control de las crisis, se incluye la alteración conformacional de los blancos terapéuticos o cambios en el sistema de recaptura de los DAEs en el cerebro, lo cual lleva a desarrollar tolerancia farmacológica que a la postre se traduce en epilepsia refractaria (40).

Para explicar los mecanismos de los diferentes factores asociados con la epilepsia fármacorresistente se han postulado varias teorías, de las cuales las dos más importantes son la *teoría de los blancos terapéuticos* (o farmacodinámica) y la *teoría de los transportadores a multifármacos* (o farmacocinética) (41).

La primera teoría se basa en los cambios adquiridos o intrínsecos que han sufrido las biomoléculas, es decir, los blancos terapéuticos reconocidos por los DAEs para el control de las crisis, como son los canales iónicos, receptores de los neurotransmisores, así como enzimas metabólicas involucradas en la liberación, recaptura y metabolismo de los neurotransmisores. Variaciones en cualquiera de estos procesos o sus etapas, motivan a que la eficacia y tolerabilidad de las DAEs sea diferente entre los pacientes con epilepsia, a pesar de presentar características análogas y un cuadro clínico idéntico (51, 58).

Teoría de los Blancos Terapéuticos

Al respecto de la primera teoría, se tienen entre los blancos terapéuticos más estudiados, los siguientes:

Canales iónicos

Algunas mutaciones en los canales iónicos son responsables de determinados síndromes epilépticos y de alguna forma contribuyen en la eficacia o resistencia de los DAEs en esos síndromes. Por lo anterior, es atractivo desarrollar antiepilépticos capaces de revertir la ineficacia de esas mutaciones y normalizar la dinámica de los síndromes actualmente incontrolados (26).

La información que se tiene sobre las mutaciones en la subunidad alfa del canal de sodio tipo 1 (SCN1A o NaV1.1) que se expresan sólo en cerebro y el espectro de síndromes epilépticos es extenso. Estas mutaciones las encontramos en el GEFS⁺, en la epilepsia mioclónica severa infantil (SMEI) o síndrome de Dravet, e incluso en casos aislados de síndromes con migraña familiar. A la fecha, ya son más de 300 nuevas mutaciones que pueden presentarse como cambios de un aminoácido por otro, o mutaciones graves como en la terminación de la proteína o un desplazamiento del marco de lectura del transcrito. La mayoría de las mutaciones en SMEI se originan *de novo*, en ellas encontramos desde anomalías mitocondriales hasta la eliminación, amplificación y duplicación de regiones en el SCN1A. La región que se elimina puede ser desde un solo exón, extenderse más allá del gen SCN1A o

involucrar a otros genes adyacentes, también se puede afectar la estructura de la proteína, solo la región C-terminal o los aminoácidos de las regiones S5 y S6 de los primeros tres dominios de la proteína (Figura 1). A pesar de identificar todas estas mutaciones, los estudios funcionales no muestran una relación consistente entre cambios en este gen y el fenotipo clínico (24). Con respecto a la ineficacia farmacológica, Lucas y colaboradores (42), han observado que una mutación en la subunidad $\beta 1$ del canal de sodio dependiente de voltaje disminuye la sensibilidad de dicho canal a la acción de la fenitoína. Otras mutaciones en genes del canal de sodio (SCN2A, SCN1B y SCN9A) se han encontrado en la epilepsia familiar benigna con crisis neonatales (BFNS), en el síndrome de Dravet y en el síndrome paroxismal con dolor crónico (25).

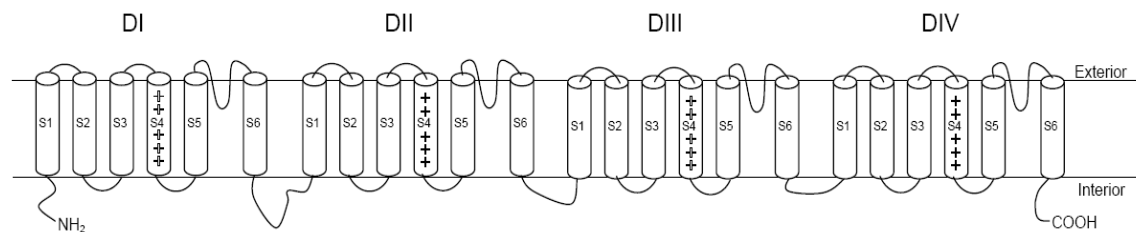


Figura 1. Representación esquemática de la sub-unidad alfa del canal de sodio (SCN1A), cada dominio (DI, DII, DIII y DIV) está compuesto por seis regiones o segmentos (S1 – S6). En los segmentos S4 de cada dominio se realiza el intercambio iónico y el segmento S6 de DIV se considera el blanco terapéutico de los DAEs para canal de Na^{+2}

Por otro lado, el canal de potasio participa en la hiperpolarización lenta de la membrana y no se inactiva con la despolarización, por lo anterior, tiene un papel en la regulación de la excitabilidad neuronal e inhibición de las descargas epileptiformes. La epilepsia benigna con crisis neonatales o EBN presenta mutaciones en los genes *KCNQ2* y *KCNQ3* que codifican para las subunidades alfa tipo 2 y 3 respectivamente del canal de potasio (50). Por último, Schenzer y colaboradores (57) han identificado que un residuo de triptófano en el segmento S5 de los canales de potasio *KCNQ3*, *KCNQ2*, *KCNQ4* y *KCNQ5*, lo que parece ser imprescindible para la acción anticonvulsionante de la retigabina (57).

Además de los canales de sodio, los receptores de tipo ionotrópico del GABA (receptor GABA_A) son blancos terapéuticos importantes en la regulación de la respuesta inhibitoria rápida, por lo que una alteración en su estructura puede llevar a diversas patologías neurológicas y psiquiátricas como la epilepsia (58). El fármaco

o ligando es reconocido por su receptor o blanco terapéutico lo que permite el acoplamiento correcto entre ambos (Figura 2). En un tejido cerebral epileptogénico, el receptor ha sufrido modificaciones estructurales en el sitio de unión al ligando, lo que no permite un acoplamiento adecuado. Lo anterior genera la inactivación del receptor y la interrupción de la señalización hacia el interior de la neurona, lo cual evita una respuesta fisiológica neuronal y no se obtiene el efecto terapéutico deseado. La gabapentina es un DAE que tiene una alta afinidad por las subunidades de los receptores GABA_A y GABA_B lo que origina el efecto anticonvulsivo. Por lo tanto, modificaciones estructurales en estas subunidades debidas a mutaciones o por el efecto de las mismas crisis disminuyen significativamente su eficacia (50).

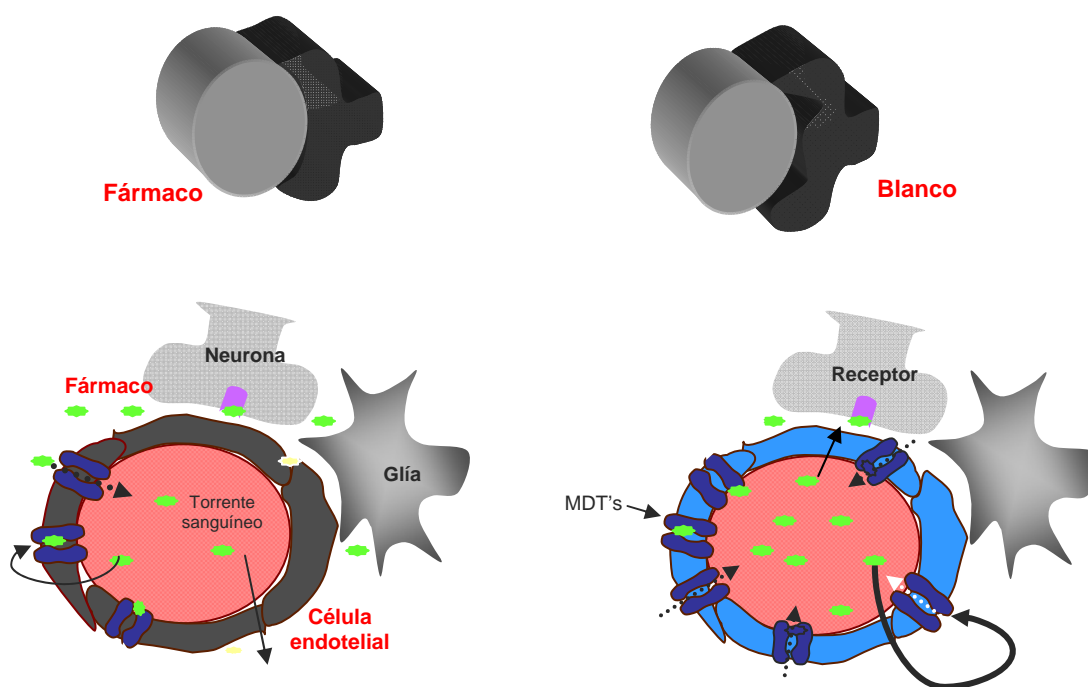


Figura 2. Representación esquemática de las teorías de los mecanismos de refractoriedad en ELT (modificado de Remy y Beck, 2006). Panel superior teoría de los blancos terapéuticos. Panel inferior, teoría de los transportadores multifármacos. En ambos casos, se muestra del lado izquierdo, la condición de sí respuesta; y del lado derecho, la condición de fármacorresistencia. BHE: barrera hematoencefálica; MDT's: transportadores de multifármacos; MRP's: proteínas asociadas a la resistencia a multifármacos.

Con respecto al estudio molecular, trabajo de nuestro grupo (en prensa) demostró que la epilepsia del lóbulo temporal (ELT) resistente al tratamiento farmacológico produce modificaciones en la expresión del RNA mensajero en cada una de las isoformas de las subunidades que conforman el receptor GABA_A. Los resultados

mostraron la sobre-expresión del RNA mensajero de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ en la corteza cerebral; y de $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\gamma 2$, en el hipocampo. Una reducción en la expresión del RNA mensajero de la subunidad $\gamma 3$ en la corteza; y de $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$, en el hipocampo. Estas alteraciones en el transcrito probablemente afectan la conformación estructural del receptor, lo que modifica su sensibilidad para reconocer a los ligandos y disminuye su eficacia terapéutica (Figura 3). Por su parte, la correlación clínica demostró, que la expresión del RNA mensajero de algunos genes involucrados en la neurotransmisión GABAérgica, puede verse afectadas por condiciones fisiopatológicas durante la evolución de la enfermedad como la edad de inicio de las crisis, la frecuencia de las crisis y los años con tratamiento farmacológico, lo que puede alterar la expresión del RNA mensajero, principalmente en corteza temporal y no en hipocampo (19). Estas condiciones fisiopatológicas también pueden producir alteraciones en la expresión de los genes de las subunidades, en la síntesis de proteína y ensamblado del receptor (28).

Teoría de los transportadores multifármacos

La segunda teoría se apoya en la participación de los transportadores multifármacos formada por las familias de genes MDR y los genes MRP, ambos grupos pertenecen a la superfamilia de transportadores ABC (ATP-binding cassette) o transportadores de membrana. Se conoce por transportadores de membrana a un grupo de proteínas involucradas en la entrada y la salida de sustancias, a través de las membranas celulares; sus funciones son asegurar su permeabilidad a fármacos, regular la concentración de éstos y proteger al organismo contra xenobióticos.

La glucoproteína P (Pgp)

Es una proteína que se ubica en la membrana apical de las células endoteliales de los capilares de la barrera hematoencefálica (BHE) (22), se codifica a través del gen *ABCB1* o *MDR1*, en humanos y los genes *MDR1a* o *MDR1b*, en roedores. Esta proteína se descubrió inicialmente como transportadora de membrana en tejidos cancerosos y se le confirió responsabilidad en la resistencia a la quimioterapia (68), posteriormente se entendió que su función fisiológica en tejidos normales de hígado, riñón, intestino y en la BHE está relacionada con la excreción y protección de tejidos a toxinas y xenobióticos.

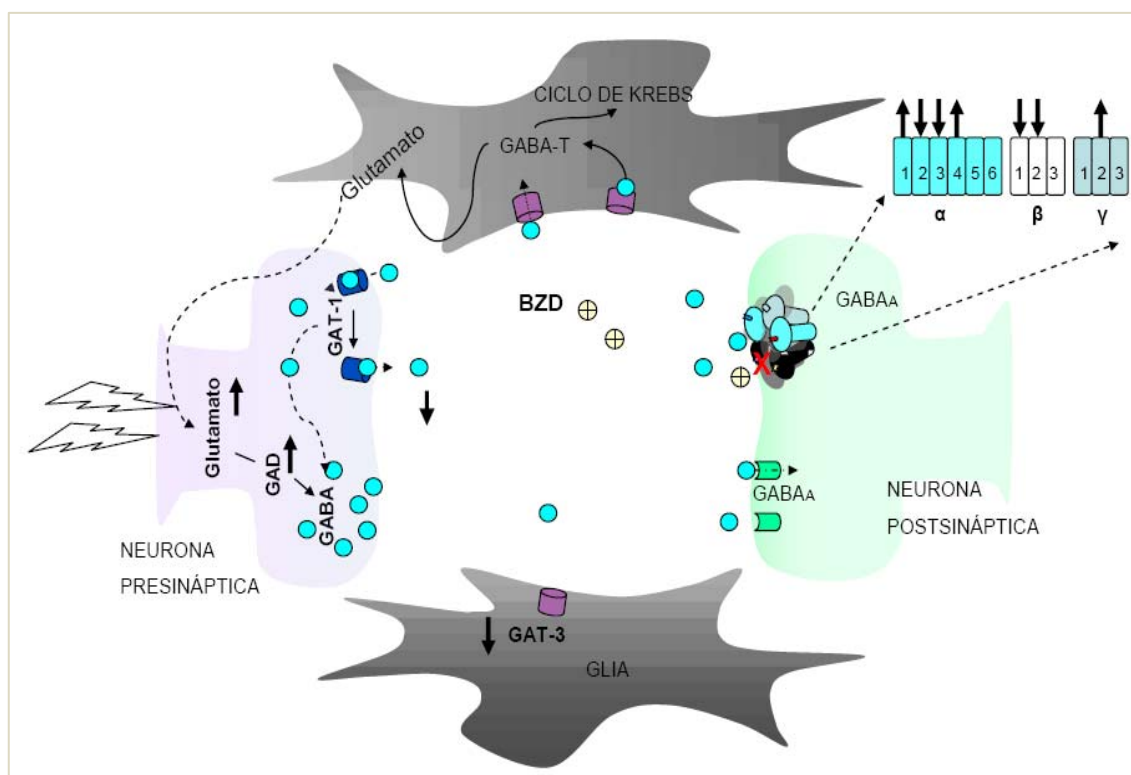
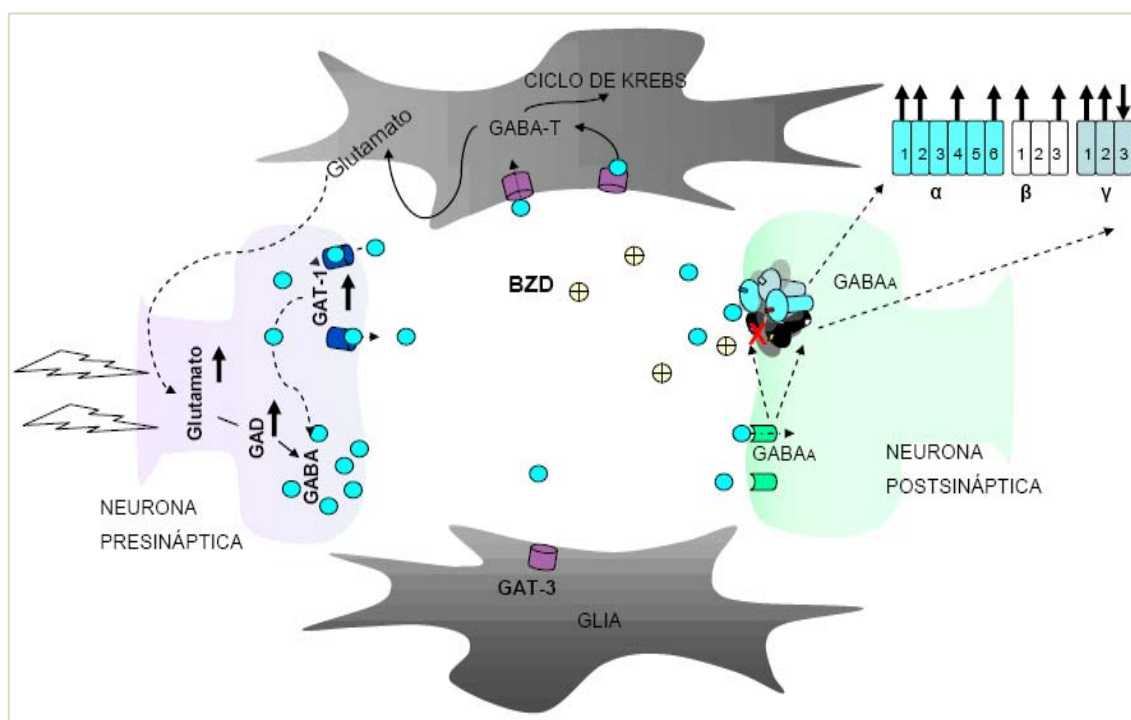


Figura 3. Principales alteraciones en los transcritos del sistema GABAérgico en A) hipocampo y B) corteza de pacientes con ELT. Las flechas sobre las subunidades del receptor GABA_A indican los cambios observados en el nivel de expresión de su RNA mensajero.

La familia MRP

Actualmente, la integran siete proteínas que transportan aniones orgánicos y drogas orgánicas neutras (8). El primer miembro de esta familia se conoce como MRP1, se descubrió en células cancerosas en 1992 y presenta funciones comunes con la Pgp. Estas proteínas también se localizan en diversos tejidos normales y la BHE. La MRP2 está ubicada en la membrana celular apical, que en muchas membranas es la posición más apropiada para ejercer su papel protector, mientras que MRP1, MRP3 y MRP5 están ubicadas basolateralmente. Las MRPs se descubrieron en la BHE en el año 2000 (71).

La BHE es impermeable a sustancias muy ionizadas e hidrofílicas, pero la mayoría de los DAEs penetran rápidamente en el parénquima cerebral por difusión simple debido a que son sustancias muy liposolubles. El mecanismo defensivo de la BHE consiste en la participación de estas proteínas transportadoras que dependen de la adenosina trifosfato y que se localizan en la membrana luminal de las células endoteliales capilares. Estas proteínas actúan como bombas que transfieren nuevamente las drogas a la sangre una vez que ya atravesaron las células endoteliales y limitan la penetración de muchas sustancias lipofílicas hacia el parénquima cerebral (70). En consecuencia, se puede estar administrando un DAE adecuado con dosis apropiadas, que no llegan al parénquima cerebral, por lo que no efectúan su acción farmacológica. Este fenómeno se ha podido reproducir en estudios experimentales (1, 59, 70) y en pacientes epilépticos con farmacorresistencia, se ha observado la sobre-expresión de la Pgp y de las MRPs por las mismas crisis incontroladas o por los propios DAEs (2, 3, 37,38, 64).

Esta teoría se comprobó mediante procedimientos inmunohistoquímicos que demostraron una sobre-expresión de Pgp y MRP2 en células endoteliales procedentes de lobectomías temporales (17). La sobreexpresión de Pgp y MRP1 se ha observado en tres causas habituales de epilepsias farmacorresistentes: tumores neuroepiteliales disembrionarios, displasia cortical focal⁶⁴ y esclerosis de hipocampo (65).

Con respecto a la acción de los DAEs, se ha demostrado que la gabapentina, topiramato, fenitoína, carbamacepina, fenobarbital y lamotrigina, son sustratos de la Pgp y transportados por dicha glucoproteína (58, 47); por otro lado, el valproato,

fenitoína y carbamacepina son sustratos de MRP; por consecuencia, todos estos DAEs pueden tener dificultades para alcanzar los lugares en donde tienen que actuar, cuando existe una sobreexpresión de transportadores.

Una vez que se comprobó la sobre-expresión de las proteínas transportadoras en la epilepsia farmacorresistente, se procedió a buscar una asociación genética. Para probar esta hipótesis, Siddiqui y colaboradores (62) apreciaron una relación entre los polimorfismos C3435T del gen ABCB1 y la respuesta al tratamiento antiepiléptico, al encontrar una mayor frecuencia del genotipo CC que el genotipo TT en los pacientes refractarios (62). Zimprich y colaboradores (2004) estudiaron 210 pacientes europeos (edad promedio de 40 años), con epilepsia en el lóbulo temporal, farmacorresistentes y estratificados (crisis/año), en los que observaron una relación entre el haplotipo CGC de las regiones C1236T, G2677T y C3435T con la farmacorresistencia a diferentes drogas antiepilépticas; además notaron que pacientes CGC homocigotos eran significativamente más farmacorresistentes (72). Seo y colaboradores (2006), en un estudio con 210 pacientes japoneses tratados con carbamazepina durante 2 años, de los cuales 126 fueron farmacorresistentes, mostraron una tendencia al alelo T en la región C3435T, el genotipo TT en las regiones G2677T/A y/o C3435T; y el haplotipo T-T-T en las regiones C1236T, G2677T/A y C3435T, asociados con la farmacorresistencia al medicamento empleado (61).

FARMACOGENÉTICA VS. FARMACOGENÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA EPILEPSIA FÁRMACORRESISTENTE

Existen diferentes vías para explicar cómo la variación genética influye o no en la respuesta o resistencia a los DAEs. El primer paso, es seleccionar un grupo de pacientes con un tipo de epilepsia en particular y posteriormente se establece si el grupo de pacientes presenta resistencia a un solo fármaco o a varios fármacos. En el caso de seleccionar un solo fármaco, se pueden determinar las variaciones genéticas que influyen en la respuesta al fármaco y en el segundo caso se puede seleccionar al grupo de antiepilépticos por presentar propiedades semejantes; en ambos casos se podrá decidir el enfoque de blanco terapéutico, la teoría del transportador multifármacos o ambos. Sin embargo, esta estrategia no ha sido suficiente para

determinar que mutaciones están presentes en los genes candidatos para relacionarlos con la epilepsia fármacorresistente. Lo anterior postula limitaciones en el tamaño de la muestra de los pacientes y los genes en estudio (63). Hasta la fecha, el estudio más cercano a esta idea se publicó recientemente, los autores presentaron un estudio de asociación genética en 3455 pacientes con síndromes de epilepsia parcial y 6935 controles de ancestros europeos utilizando todo el genoma, con la finalidad de encontrar un componente hereditario evidente. Sin embargo, no lograron identificar una asociación genética clara entre este tipo de síndromes, por lo que proponen realizar un metanálisis en síndromes específicos debido a la heterogeneidad del genotipo y fenotipo (29).

Al valorar la información anteriormente descrita resulta evidente que, de manera paulatina, en la selección del fármaco que va a administrarse a cada paciente con epilepsia van a intervenir, además de una buena valoración electroclínica, las características bioquímicas, enzimáticas y genéticas, de tal manera que se daría un gran avance hacia la medicina personalizada, o hacia el “tratamiento a la carta”, con la que se pueda asegurar una mayor eficacia del DAE seleccionado, así como una minimización del riesgo de efectos adversos o por último buscar terapias alternativas a la farmacológica.

REFERENCIAS

1. Abbot NJ, Khan EU, Rollinson MS, Reichel A, Janigro D, Dombrowski SM, et al. Drug resistance in epilepsy: the role of the blood-brain barrier. In: Mechanisms of drug resistance in epilepsy: lessons from oncology. Novartis Foundation, Symposium 243. Chichester: John Wiley; 2002. p. 38-47.
2. Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, Redeker S, Ozbas-Gerczeker F, Van Vliet EA, et al. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45: 441-51.
3. Aronica E, Porter JA, Jansen GH, Van Veelen CW, Van Rijen PC, Leenstra S, et al. Expression and cellular distribution of multidrug transporters proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumours. *Neuroscience* 2003; 118: 417-29
4. Benedetti MS. Enzyme induction and inhibition by new antiepileptic drugs: a review of human studies. *Fundam Clin Pharmacol.* 2000; 14(4):301-19.
5. Ben-Menachem E. Strategy for utilization of new antiepileptic drugs. *Curr Opin Neurol.* 2008; 21(2):167-72.
6. Bjerre I, Corelius E. Benign familial neonatal convulsions. *Acta Paediat. Scand.* 1968; 57: 557-561.
7. Björnsson E. Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand.* 2008; 118(5): 281-90.
8. Borst P, Evers R, Kool M, Wijdholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461: 347-57.
9. Brown TR., Holmes GL. 2001. *Epilepsy. N Engl J Med.* 344:1145-1151.

10. Carrico JM. Human Genome Project and pharmacogenomics-implications for pharmacy. *J Am Pharm Assoc.* 2000; 40:115-16.
11. Cendes F, Lopes-Cendes I, Andermann E, Andermann F. Familial temporal lobe epilepsy: a clinically heterogeneous syndrome. *Neurology.* 1998; 50: 554-557.
12. Chung WH, Hung SI, Chen YT. Genetic predisposition of life-threatening antiepileptic-induced skin reactions. *Expert Opin Drug Saf.* 2010; 9(1):15-21.
13. Collins F. Shattuck lecture: medical and societal consequences of the human genome project. *N Engl J Med.* 1999; 341:28-37.
14. Dawood S, Leyland-Jones B. Pharmacology and pharmacogenetics of chemotherapeutic agents. *Cancer Invest.* 2009; 27(5):482-8.
15. Dooze H, Petersen B, Neubauer BA. Occipital sharp waves in idiopathic partial epilepsies--clinical and genetic aspects. *Epilepsy Res.* 2002; 48(1-2):121-30.
16. Dreifuss FE. Juvenile myoclonic epilepsy: characteristics of a primary generalized epilepsy. *Epilepsia.* 1989; 30 (suppl. 4): S1-S7.
17. Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W, Mayberg MR, Bengeiz L, Janigro D. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia.* 2001; 42(12):1501-6.
18. Engel, J. Models of focal epilepsy. In: *Advances in Clinical Neurophysiology.* Editors: Hallett M, Phillips LH, Shomer DL, Massey JM. Ed. Elsevier. California, USA. 2004, pag 392-399.
19. Escalante-Santiago D. Estudio molecular de las alteraciones en la neurotransmisión gabaérgica, en tejido de pacientes con cirugía de epilepsia del lóbulo temporal refractarios a tratamiento farmacológico. Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Posgrado en Ciencias Genómicas. Tesis de Maestría en Ciencias Genómicas. 2009.
20. Fong GCY, Shah PU, Gee MN, Serratosa JM, Castroviejo IP, Khan S, Ravat SH, Mani J, Huang Y, Zhao HZ, Medina MLT, Treiman L J, Pineda G, Delgado-Escueta AV. Childhood absence epilepsy with tonic-clonic seizures and electroencephalogram 3-4-Hz spike and multispikes-slow wave complexes: linkage to chromosome 8q24. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 63: 1117-1129.
21. Franzoni E, Bracceschi R, Colonnelli MC, Errani A, Ucchino V, Malaspina E, Moscano F, Cecconi I, Tzolas V, Marchiani V. Clinical features of benign infantile convulsions: familial and sporadic cases. *Neurology.* 2005; 65: 1098-1100.
22. Fromm MF. P-glycoprotein a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38: 69-74.
23. Fukushima Y, Seo T, Hashimoto N, Higa Y, Ishitsu T, Nakagawa K. Glutathione-S-transferase (GST) M1 null genotype and combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes are risk factors for increased serum gamma-glutamyltransferase in valproic acid-treated patients. *Clin Chim Acta.* 2008; 389(1-2):98-102.
24. Gambardella A, Marini C. Clinical spectrum of SCN1A mutations. *Epilepsia.* 2009; 50 Suppl 5:20-3.
25. Gardiner M. Molecular genetics of infantile nervous system channelopathies. *Early Hum Dev.* 2006; 82(12):775-9.
26. Herranz JL. Epilepsia mioclónica grave de la infancia (síndrome de Dravet). Aspectos genéticos. *Rev Neurol* 2003; 37: 60-3.
27. Hilton EJ, Hosking SL, Betts T. The effect of antiepileptic drugs on visual performance. *Seizure.* 2004; 13(2):113-28.
28. Ito T, Suzuki T, Wellman SE, Ho IK. Chronic pentobarbital administration alters gamma-aminobutyric acid A receptor alpha 6-subunit mRNA levels and diazepam-insensitive [3H] Ro15-4513 binding. *Synapse.* 1996. 22(2):106-13.
29. Kasperaviciute D, Catarino CB, Heinzen EL, Depondt C, Cavalleri GL, Caboclo LO, Tate SK, Jamnadas-Khoda J, Chinthapalli K, Clayton LM, Shianna KV, Radtke RA, Mikati MA, Gallentine WB, Husain AM, Alhusaini S, Leppert D, Middleton LT, Gibson RA, Johnson MR, Matthews PM, Hosford D, Heuser K, Amos L, Ortega M, Zumsteg D, Wieser HG, Steinhoff BJ, Krämer G, Hansen J, Dorn T, Kantanen AM, Gjerstad L, Peuralinna T, Hernandez DG, Eriksson KJ, Kälviäinen RK, Doherty CP, Wood NW, Pandolfo M, Duncan JS, Sander JW, Delanty N, Goldstein DB, Sisodiya SM. Common genetic variation and susceptibility to partial epilepsies: a genome-wide association study. *Brain.* 2010; 133(Pt 7):2136-47.
30. Kasperaviciute D, Sisodiya SM. Epilepsy pharmacogenetics. *Pharmacogenomics.* 2009; 10(5):817-36.

31. Kini U, Lee R, Jones A, Smith S, Ramsden S, Fryer A, Clayton-Smith J; Liverpool Manchester Neurodevelopmental Study Group. Influence of the MTHFR genotype on the rate of malformations following exposure to antiepileptic drugs in utero. *Eur J Med Genet.* 2007; 50(6):411-20.
32. Klein KM, Hamer HM, Reis J, Schmidtke J, Oertel WH, Theisen FM, Hebebrand J, Rosenow F. Weight change in monozygotic twins treated with valproate. *Obes Res.* 2005; 13(8):1330-4.
33. Kugler, S. L., Bali, B., Lieberman, P., Strug, L., Gagnon, B., Murphy, P. L., Clarke, T., Greenberg, D. A., Pal, D. K. An autosomal dominant genetically heterogeneous variant of rolandic epilepsy and speech disorder. *Epilepsia* 49: 1086-1090, 2008.
34. Kwan P., Arzimanoglou A., Berg AT, Brodie MJ, Hauser WA, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc task force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia.* 2010; 51(6):1069-1077.
35. Kwan P., Brodie M. Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition? *Seizure.* 2002; 11: 77-84.
36. Lazarou J, Pomeranz B, Corey P. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta analysis of prospective studies. *JAMA.* 1998; 279: 1200-1205.
37. Lazarowski A, Lubieniecki F, Camarero HT, Pomata H, Bartuluchi H, Sevlever G, et al. Multidrug resistance proteins in tuberous sclerosis and refractory epilepsy. *Pediatr Neurol* 2004; 102: 30-6.
38. Lazarowski A, Sevlever G, Taratuto A, Massaro M, Rabinowicz A. Tuberous sclerosis associated with MDR1 gene expression and drugresistance epilepsy. *Pediatr Neurol* 1999; 21: 731-734.
39. López de Munain A, Sáenz A, Ayerdi A, Martí Massó JF. Paroxysmal Neurological Disorders. En *Textbook of Neurogenetics*. Editor Jiménez Escrig A, Ed. Díaz de Santos. Madrid, Spain. 2007, pag 284.
40. Löscher W., Potschka H. Role of Multidrug Transporters in Pharmacoresistance to Antiepileptic Drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 301: 7-14.
41. Löscher W., Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: the search for new targets. *Epilepsy Res.* 2001; 60: 77-159.
42. Lucas PT, Meadows LS, Nicholls J, Ragsdale DS. An epilepsy mutation in the beta1 subunit of the voltage-gated sodium channel results in reduced channel sensitivity to phenytoin. *Epilepsy Res.* 2005; 64(3):77-84.
43. Obeid T. Clinical and genetic aspects of juvenile absence epilepsy. *J. Neurol.* 1994; 241: 487-491.
44. Pack AM, Morrell MJ. Epilepsy and bone health in adults. *Epilepsy Behav.* 2004; 5 Suppl 2:S24-9.
45. Park SP, Kwon SH. Cognitive effects of antiepileptic drugs. *J Clin Neurol.* 2008; 4(3):99-106.
46. Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA.* 2001; 286(18):2270-9.
47. Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuroreport.* 2001; 12(16):3557-60.
48. Programa prioritario de Epilepsia. 2001. Lineamientos para el tratamiento de la epilepsia. SSA, Academia Mexicana de Neurología, OMS, CAMELICE.
49. Regesta G, Tanganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug resistant epilepsies. *Epilepsy Res.* 1999; 34; 109-122.
50. Rogawski MA, Bazil CW. New Molecular Targets for Antiepileptic Drugs: $\alpha 2\delta$, SV2A, and Kv7/KCNQ/M Potassium Channels. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2008; 8(4): 345-352.
51. Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5: 553-564.
52. Sander JW. Aetiology and risk factors. En *Atlas Epilepsy Care in the World*. Programme Leader L. Prilipko, Ed. WHO. Geneva, Switzerland. 2005, pag 26.
53. Sander JW. Some aspects of prognosis in the epilepsies: A review. *Epilepsia.* 1993; 34: 1007-1016.
54. Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain.* 1997; 120: 479-490.
55. Scheffer IE, Bhatia KP, Lopes-Cendes I, Fish DR, Marsden CD, Andermann E, Andermann F, Desbiens R, Keene D, Cendes F, Manson JI, Constantinou JEC, McIntosh A, Berkovic SF. Autosomal dominant nocturnal frontal epilepsy: a distinctive clinical disorder. *Brain.* 1995; 118: 61-73.
56. Scheffer IE, Phillips HA, O'Brien CE, Saling MM, Wrennall JA, Wallace RH, Mulley JC, Berkovic SF. Familial partial epilepsy with variable foci: a new partial epilepsy syndrome with suggestion of linkage to chromosome 2. *Ann. Neurol.* 1998; 44: 890-899.

57. Schenzer A, Friedrich T, Pusch M, Saftig P, Jentsch TJ, Grötzinger J, Schwake M. Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neurosci.* 2005; 25(20):5051-60.
58. Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: Putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia.* 2005; 46(6): 858-877.
59. Seegers U, Potschka H, Löscher W. Expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells and brain parenchyma of amigdala-kindled rats. *Epilepsia* 2002; 43: 675-84.
60. Semah F., Picot MC., Adam C., Broglin D., Arzimanoglou A., Bazin B., Calvalcanti D., Baulac M. 1998. Is the underlying cause of epilepsy a major prognosis factor for recurrence? *Neurology.* 51: 1256-1262.
61. Seo T, Ishitsu T, Ueda N, Nakada N, Yurube K, Ueda K, Nakagawa K. ABCB1 polymorphisms influence the response to antiepileptic drugs in Japanese epilepsy patients. *Pharmacogenomics* 2006; 7(4):551-61
62. Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, Wood NW, Sisodiya SM. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 2003; 348(15):1442-8.
63. Sisodiya S. Pharmacogenetics of drug resistance in epilepsy. In: *Genetics of epilepsy and genetic epilepsies.* Edited by: Avanzini G and Noebels J. Ed. John Libbey Eurotext. Milan, Italy. 2009, pag. 247-253.
64. Sisodiya SM, Lin WR, Squier MV, Thom M. Multidrug-resistance protein 1 in focal cortical dysplasia. *Lancet* 2001; 357: 42-3.
65. Sisodiya SM., Lin WR., Harding BN., and Squier MV., Thom M. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain.* 2002; 125: 22-31.
66. Tate SK, Depondt Ch, Sisodiya SM, Cavalleri GL, Schorge S, Soranzo N, Thom M, Sen A, Shorvon SD, Sander JW, Wood NW, Goldstein DB. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *PNAS* 2005; 102(15):5507-5512.
67. Tomson T, Battino D. Teratogenic effects of antiepileptic medications. *Neurol Clin.* 2009; 27(4):993-1002.
68. Varadi A, Szakacs G, Bakos E, Sarkadi B. P glycoprotein and the mechanism of multidrug resistance. In: *Mechanisms of drug resistance in epilepsy: lessons from oncology.* Novartis Foundation, Symposium 243. Chichester: John Wiley; 2002. p. 54-68.
69. Verrotti A, la Torre R, Trotta D, Mohn A, Chiarelli F. Valproate-induced insulin resistance and obesity in children. *Horm Res.* 2009; 71(3):125-31.
70. Wijnholds J. Drug resistance caused by multidrug resistance-associated proteins. In: *Mechanisms of drug resistance in epilepsy: lessons from oncology.* Novartis Foundation, Symposium 243. Chichester: John Wiley; 2002: 69-79
71. Zhang Y, Han H, Elmquist WF, Miller DW. Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* 2000; 876(1-2):148-53.
72. Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal-Bianco A, Zimprich A, Plumer S, Baumgartner C, Mannhalter C. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2004; 63(6):1087-1089

NEUROPATHOLOGÍA QUIRÚRGICA DE LA EPILEPSIA FOCAL FÁRMACORRESISTENTE

¹Estupiñán-Díaz BO, ¹García-Maeso I, ²Feria-Velasco AI.

¹Programa Cirugía de Epilepsia, Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN), La Habana, Cuba.

²Laboratorio de Neurobiología Celular, Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

INTRODUCCION

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más frecuente, superado solo por los accidentes vasculares encefálicos y constituye un problema serio de salud, tanto para países desarrollados o no (15, 52).

Los Bancos de Anatomía Patológica de centros dedicados al tratamiento quirúrgico de la epilepsia, refieren las causas más frecuentes en la población pediátrica menor de 18 años de la manera siguiente: displasia cortical (DC) 42%, tumores 19%, atrofia-infarto (incluye las causas infecciosas y otras formas de daño cerebral) 10% y por último la esclerosis hipocampal (EH) con el 6%. Estas causas en la población adulta varían en frecuencia: EH 43%, tumores 30%, DC 13% y las lesiones vasculares (angioma cavernoso y malformación arteriovenosa) para un 7% (26).

El objetivo de este capítulo es proporcionar a patólogos, neurólogos, clínicos y demás especialistas involucrados en el estudio y tratamiento de las epilepsias, las características macro y microscópicas de las causas más frecuentes observadas en el tejido resecado de pacientes con epilepsia focal fármaco resistente (EFR).

ESCLEROSIS MESIAL DEL TEMPORAL (EMT)

La EMT, también conocida como esclerosis del cuerno de Ammon o EH es una anomalía difusa y encierra alteraciones en las siguientes áreas anatómicas: giro

hipocampal, corteza entorrinal y la amígdala (9, 29, 63). Se describió por vez primera en 1825, por Bouchet y Cazauvieil, quienes evidenciaron alteraciones macroscópicas en el hipocampo de 8 pacientes epilépticos (endurecimiento y reducción del tamaño del cuerno de Ammon). Sin embargo, ellos no llegaron a darle un significado etiológico a estos descubrimientos. Fue Sommer en 1880, el que describió las alteraciones histopatológicas (pérdida de células piramidales en áreas restringidas del hipocampo), postulando que la atrofia hipocampal asimétrica se relacionaba directamente con la epilepsia (46).

Desde el punto de vista macroscópico, en la EMT se aprecia una formación hipocampal reducida en tamaño, encogida y endurecida así como pérdida de la cinta cortical normal (8). Al microscopio, se observa una pérdida neuronal en las áreas CA1, CA3, CA4 y en la capa de células granulares del giro dentado asociada a una gliosis difusa, mientras que el área CA2 (considerada como zona de resistencia) está relativamente preservada (2), no obstante algunos autores han apreciado daño variable en esta área (29). Las neuronas piramidales que sobreviven pueden presentar cambios estructurales como alteraciones de la sustancia de Nissl, pérdida de la polaridad y una disposición anormal de las dendritas, estos cambios son más evidentes con la realización de técnicas especiales e inmunohistoquímicas (IHQ) (29). Se describe además la no afectación del *subiculum* (muy cercano al área CA1), fenómeno que aún no tiene explicación (2), por su parte, Lubieniecki y colaboradores han apreciado una afectación menor en esta área (29).

Otra característica apreciable microscópicamente en el hipocampo resecaado, es la dispersión de la capa de células granulosas del giro dentado (24, 30), cuyo significado aún no está claro. Los mecanismos para explicar esta dispersión pudieran estar dados por una neurogénesis de las células granulosas durante el curso de la epilepsia del lóbulo temporal (54) o que resulte de eventos malformativos antes del nacimiento (2).

Varios estudios basados en reportes de casos (27, 37, 55) o pequeñas series de pacientes (11, 12, 25, 32, 50, 60) han descrito además, una acumulación abundante de cuerpos amiláceos (CA) en el hipocampo resecaado de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal fármacorresistente. Por lo anterior, se considera a los CA como

marcador de EMT en casos donde la pérdida neuronal y la gliosis no son apreciadas con facilidad, sobre todo en las lobectomías que no son realizadas en bloque (12).

Se han propuesto varios sistemas de gradación para la EMT, basados en la severidad de la pérdida de neuronas y sus sinapsis en las áreas afectadas (28, 49, 61, 63).

MALFORMACIONES DEL DESARROLLO CORTICAL (MDC)

Las MDC desde el punto de vista de su definición, han sido descritas como una variedad de anomalías estructurales del cerebro las cuales se originan durante la gestación (53). En tanto otros la describen como un grupo heterogéneo de desórdenes, caracterizados por una desorganización de la arquitectura normal de la corteza cerebral y clínicamente por epilepsia de difícil control, retraso en la adquisición de pautas madurativas, variable retraso intelectual y déficit neurológico (29), o como un grupo heterogéneo de desarreglos anatómicos, focales y difusos, caracterizados por irregularidades en la proliferación glial y cortical, migración neuronal anormal así como una inadecuada organización cortical. Estas alteraciones son provocadas por diferentes factores: genéticos, vasculares y tóxicos entre otros, los cuales pueden actuar en el periodo intrauterino, perinatal e incluso postnatal (18, 41, 57).

A pesar de los intentos realizados por paneles de expertos y grupos de trabajos, la literatura científica consultada sigue siendo confusa en relación a la terminología de las MDC, referidas también como desórdenes de la migración neuronal, disgenesia cortical, DC que incluye a su vez a la heterotopia y polimicrogiria a extensas lesiones que pueden involucrar un hemisferio completo o conformar síndromes genéticos definidos (47).

El aspecto morfológico de las MDC está dado por una amplia variabilidad de patrones (47, 48):

- **Agiria o lisencefalia:** caracterizada por una superficie cerebral lisa sin giros corticales; puede ser parcial o completa. Se divide en: Tipo I: ausencia total o subtotal de giros y surcos, excepto en la fisura interhemisférica y silviana con marcado ensanchamiento de la corteza y Tipo II: apariencia de adoquín con un fino salpicado de toda o parte de la superficie cortical, al corte engrosamiento variable. Histológicamente la corteza consiste de 3 a 5 capas con neuronas mal orientadas y

alteraciones en el tamaño y la morfología, gliosis reactiva y en la tipo II se aprecian grupos irregulares de neuronas separados por septos gliovasculares.

- **Paquigiria:** número reducido de circunvoluciones, en ocasiones aparecen giros de superficie ancha y a los cortes aparece una corteza excepcionalmente gruesa y reducción del volumen de la sustancia blanca.

- **Polimicrogria o micropoligiria:** la superficie cerebral está formada por giros pequeños e irregulares separados por surcos poco profundos, ocasionalmente los giros pueden ser focalmente anchos y a los cortes la superficie es frecuentemente fina y tiene una apariencia festoneada. Histológicamente encontramos una corteza de 2 a 4 capas (la corteza de 4 capas es la que se observa con mayor frecuencia) y la leptomenínge está anormalmente vascularizada relacionada con la persistencia de vasos fetales.

- **Heterotopia:** evidencia macro y microscópica de neuronas en sitios anormales (Ej. superficie pial, sustancia blanca o debajo del epéndimo), y puede tener una disposición nodular y laminar. La heterotopia nodular es la forma más común y se localiza en la región subependimaria, adyacente a los ventrículos laterales y con menor frecuencia en la sustancia blanca profunda; histológicamente observamos neuronas que difieren en tamaño y número. La variante laminar (en banda), referida también como doble corteza, se caracteriza por una disposición lineal o multinodular de las neuronas en la sustancia blanca, o en ocasiones paralelo a la cinta cortical pero separada por sustancia blanca. La corteza cerebral puede ser normal o mostrar una displasia.

El término de displasia cortical focal (DCF) se reserva para la malformación cortical descrita por Taylor y colaboradores (58). En tanto las displasias microscópicas ligeras con alteraciones sutiles, han sido indistintamente referidas como microdisgenesia, displasia focal ligera, displasia no Taylor, displasia arquitectural, displasia citoarquitectural o hamartias glioneuronales. Esta variada nomenclatura provoca confusiones para una adecuada comprensión de las particularidades epileptogénicas y funcionales de cada una de las entidades (40, 41, 57).

La DCF en su aspecto macroscópico evidencia una expansión de los giros, engrosamiento focal de la corteza y al corte se aprecia una pobre delimitación entre la sustancia gris y blanca (19).

Desde que en 1984, Meencke y Janz propusieran el término de microdisgenesia (33), el mismo ha provocado un desconcierto significativo. Algunos trabajos resumen las alteraciones microscópicas de la microdisgenesia: 1) neuronas subpiales; 2) aumento del número de neuronas en las capas I y II de la corteza; 3) heterotopia neuroglial leptomeníngea; 4) persistencia de la arquitectura columnar de las neuronas corticales; 5) agrupamiento neuronal y glial; 6) estructura laminar irregular; 7) hipermielinización superficial; 8) neuronas aisladas o en pequeños grupos en la sustancia blanca con satelitosis glial perineuronal; 9) satelitosis glial perivascular en la sustancia blanca; y 10) dispersión de la capa de células granulosas del giro dentado (1, 2, 45).

El significado clínico de la microdisgenesia en epilepsia se debate aún, debido en parte a la ausencia de criterios diagnósticos, la no existencia de un consenso en los criterios cuantitativos, las dificultades encontradas en tratar de correlacionar la microdisgenesia con los datos clínicos así como su presencia en otras enfermedades (16). Palmini y colaboradores, proponen abandonar el término de microdisgenesia por la confusión que provoca (41).

Existen varias formas de clasificar a las MDC con un enfoque diferente de la problemática sin que exista aún un esquema que cubra todos los aspectos. Se han publicado disímiles clasificaciones, para los genetistas clínicos se describen todas las posibles presentaciones de las MDC de forma tal que se tenga una máxima definición de cada una (3); en tanto para los clínicos y cirujanos, interesados en la evaluación preoperatoria y tratamiento quirúrgico de pacientes con epilepsia fármaco resistente le son más útiles las clasificaciones histopatológicas (40, 41, 57). Para los embriólogos, interesados en medir las alteraciones genético-ambientales que conllevan a las alteraciones anatómicas, requieren de clasificaciones que especifiquen las contrapartes histológicas de los diferentes pasos de la formación cortical y sus desarreglos (34).

De todas las clasificaciones mencionadas anteriormente, la propuesta por Palmini y colaboradores se acerca a los intereses profesionales de clínicos, neurorradiólogos, neurocirujanos y neuropatólogos, todos ellos involucrados en centros dedicados a cirugía de la epilepsia (41).

La clasificación de DCF sugerida por Palmieri y colaboradores es la siguiente (41):

1. Malformaciones del desarrollo cortical ligeras (MDCL):

- Tipo I: exceso de neuronas localizadas ectópicamente en la capa I o adyacente a esta.
- Tipo II: heterotopia neuronal fuera de la capa I.

2. Displasia cortical focal (DCF):

- Tipo I: ausencia de neuronas dismórficas o balonadas:

- Tipo IA: anormalidades arquitecturales aisladas (dislaminación, acompañada o no por otras alteraciones de las MDCL).
- Tipo IB: anormalidades arquitecturales más neuronas gigantes o inmaduras.

- Tipo II: DCF tipo Taylor (neuronas dismórficas con o sin células balonadas):

- Tipo IIA: anormalidades arquitecturales con neuronas dismórficas sin células balonadas.
- Tipo IIB: anormalidades arquitecturales con neuronas dismórficas y células balonadas.

Es importante tener en cuenta que en ocasiones las MDC pueden estar asociadas con neuronas displásicas y células balonadas con una RMN negativa (17, 38, 39).

Otros hallazgos vistos al microscopio óptico en la corteza de pacientes con DCF son los siguientes: CA con una distribución perivascular, en la superficie meníngea y en la sustancia blanca; espacios vasculares amplios; cambios espongióticos y astrogliosis, ilustrada por la proteína ácida gliofibrilar (GFAP) (17, 27, 36).

TUMORES Y EPILEPSIA

Los tumores que con mayor frecuencia se asocian a epilepsia focal fármaco resistente son: astrocitomas, astrocitoma pilocítico, xantoastrocitoma pleomórfico (XAP), oligodendrogliomas, tumor neuroepitelial disembrionárico (TND) y ganglioglioma (GG), estos dos últimos infrecuentes en la práctica quirúrgica habitual pero con una alta incidencia en centros dedicados al tratamiento quirúrgico de la epilepsia y asociados a DCF en más del 80% de los casos (42, 51, 56, 59) y se caracterizan por un curso indolente, rasgos patológicos benignos y una larga supervivencia (42).

En este apartado abordaremos las características del XAP, TND y el GG por lo infrecuente que resultan.

El XAP es una variante del astrocitoma que se caracteriza por afectar a niños y adultos jóvenes que con frecuencia presentan un trastorno convulsivo de larga evolución, localización cortical superficial (predominio temporal) con compromiso meníngeo y con un pronóstico relativamente favorable. Le corresponde el grado II de la OMS (20). Ha sido descrito también en el cerebelo y en la médula espinal (21, 35). Relacionado con su incidencia le corresponde menos del 1% de todos los tumores astrocíticos (20).

Macroscópicamente, es un tumor sólido o frecuentemente quístico con un nódulo mural, atachado a las meninges y en ocasiones calcificado. Histológicamente encontramos células fusiformes entremezcladas con astrocitos gigantes mono o multinucleados con variación en el tamaño y su coloración, inclusiones intranucleares, astrocitos lipidizados, cuerpos granulares intensamente eosinofílicos o pálidos, focos de linfocitos y células plasmáticas así como fibras de Rosenthal sobre todo en la periferia del tumor. Con técnicas de plata se demuestra mejor la presencia de fibras reticulares y las células a su vez, pueden estar rodeadas de una membrana basal (reticulita positiva). Al microscopio electrónico se reconoce como una lámina basal pericelular. En los casos donde se observen 5 o más mitosis por 10 campos de gran aumento y necrosis puede utilizarse el término de XAP con rasgos de anaplasia. El inmunomarcaje evidencia positividad para la GFAP, proteína S100 y marcadores neuronales (por la tendencia marcada a la diferenciación neuronal) (20).

Se ha visto recurrencia en tumores no resecados completamente, el aspecto histológico puede ser similar a la lesión original o presentar rasgos de anaplasia, reportándose la transformación maligna en el 15-20% de los casos (20, 43).

El diagnóstico diferencial debe realizarse con los siguientes tumores: glioblastoma multiforme, gliosarcoma, histiocitoma fibroso maligno y sarcoma pleomórfico por el marcado pleomorfismo nuclear y los focos que semejan una diferenciación mesenquimal pero los cuerpos granulares eosinofílicos no se encuentran en estos tumores y la presencia de reticulina ayuda a descartar el glioblastoma. Otro tumor a tener en cuenta es el GG, el que muestra menor pleomorfismo y no encontramos

astrocitos lipidizados, y el elemento neuronal es más visible. Debe diferenciarse también con el astrocitoma pilocítico por el pleomorfismo nuclear pero carece de la reticulina intercelular. Desde el punto de vista clínico con el meningioma (43).

El TND y el GG están incluidos en el grupo de tumores glioneuronales y neuronales mixtos (5, 13). Cuando se revisan las características clínicas de estos dos tumores encontramos que ambos afectan a personas jóvenes con epilepsia fármaco resistente de larga evolución, con especial predilección por el lóbulo temporal y de manera general comparten un excelente pronóstico con la resección completa de la lesión. Con el análisis microscópico, ambos están compuestos por células gliales y neuronales y asociados a DC (42, 51, 56, 59).

El TND se caracteriza por un curso benigno, afecta a niños y a adultos jóvenes con epilepsia fármaco resistente, localización intracortical (comúnmente supratentorial) y aspecto multinodular. Le corresponde el grado I de la OMS (13). Varios autores lo han considerado como una lesión hamartomatosa atípica y esto se debe a su localización en la sustancia blanca, la frecuente asociación con DC, la curación aparente de los enfermos tras la resección completa así como una disposición desorganizada de los componentes glial y neuronal que carecen de una atipia citológica importante (44, 62). Le corresponde menos del 1% de todos los tumores cerebrales primarios (43), pero en centros dedicados al tratamiento quirúrgico de la epilepsia, resultó ser el tumor más frecuente en una serie de 327 pacientes, afectando a 61 de 94 pacientes con tumores de bajo grado de malignidad (42).

Desde el punto de vista macroscópico, el tamaño varía de pocos milímetros a varios centímetros (42), consistencia viscosa así como un aspecto multinodular cuando es resecado completamente (13). Está constituido por el componente glioneuronal específico (forma simple) y el componente de nódulos gliales (astrocítico, oligodendrocítico y elemento neuronal). Cuando ambos componentes se observan se le denomina forma compleja. Microscópicamente, lo característico es el elemento glioneuronal específico y se describe como una estructura columnar, perpendicular a la superficie cortical y haces de axones rodeados por células pequeñas similares a oligodendrocitos (*oligo-like*), entre las columnas apreciamos neuronas que flotan en una matriz de mucina. Entre estas células encontramos astrocitos estrellados los cuales son positivos a la GFAP. La presencia de mitosis, necrosis e hiperplasia

endotelial es rara (13, 43), no obstante a lo planteado, se han referido rasgos que apoyan una patogénesis neoplásica en el TND dados por una marcada celularidad, actividad proliferativa, aparente multifocalidad y el reporte reciente de transformación maligna en un caso incompletamente reseado (22, 44). Duggal y colaboradores refirieron dos pacientes con TND que mostraron pleomorfismo nuclear, proliferación vascular y mitosis atípicas en el componente astrocítico del nódulo glial. Uno de los enfermos presentó una recidiva del tumor a los 11 años de la intervención con transformación maligna, en tanto el otro paciente tras un periodo de seguimiento de 4 años no ha evidenciado recidiva de la lesión (14).

El análisis inmunohistoquímico demuestra positividad para marcadores neuronales (sinaptofisina, cromogranina, neurofilamento y MAP2) y proteína S100, positiva en las células *oligo-like*. El diagnóstico diferencial debe realizarse con el oligodendroglioma sobre todo en las biopsias pequeñas, pero la presencia de invasión cortical, satelitosis perineuronal y afectación de la sustancia blanca son elementos que están a favor de un oligodendroglioma. Diferenciarlo también con el GG y el astrocitoma pilocítico, estos son tumores más delimitados y con abundantes cuerpos granulares eosinofílicos y fibras de Rosenthal (43).

El GG por su parte es un tumor neuroepitelial bien diferenciado, raro, de crecimiento lento, cuya incidencia es del 0.4% de todos los tumores del SNC y el 1.3% en series grandes de tumores cerebrales (5). Son referidos como los tumores que con mayor frecuencia se asocian a la epilepsia del lóbulo temporal, afectando al 40% de un total de 209 pacientes reportado por Blümcke y colaboradores (6) y en el 15-25% de los enfermos en otras series (62, 64).

Macroscópicamente es un tumor intracortical, firme, bien circunscrito, sólido o quístico con ligero efecto de masa así como la presencia de calcificación. Al microscopio óptico es un tumor glioneuronal, caracterizado por neuronas displásicas (bi o multinucleadas) desorganizadas, el componente glial recuerda al astrocitoma pilocítico, fibrilar y oligodendroglioma. Otros hallazgos son la presencia de cuerpos granulares eosinofílicos y fibras de Rosenthal, infiltrado linfocítico perivascular, calcificaciones, red de fibras reticulares y una sobresaliente red de capilares. Las mitosis, la hiperplasia endotelial y la necrosis son raras, excepto en los casos con transformación maligna (5, 43). Puede apreciarse también focos de DC.

Los GG son grado I de acuerdo a la clasificación de tumores de la OMS (5), se han sugerido criterios para los GG grado II pero estos no han sido establecidos (31), algunos GG muestran rasgos anaplásicos en el componente glial y son diagnosticados como GG anaplásicos, grado III (7, 31).

El diagnóstico diferencial debe realizarse con el astrocitoma pilocítico y el XAP, pero solo en el GG encontramos el componente neuronal bien desarrollado. Diferenciarlo también con el astrocitoma fibrilar con neuronas corticales atrapadas, las cuales son citológicamente normales y arquitecturalmente bien organizadas; el TND tiene neuronas normales y flotan en lagos de mucina y el elemento glial recuerda más a un oligodendroglioma que un astrocitoma y por último con la DC la que carece de espacios quísticos, cuerpos granulares eosinofílicos e infiltrado linfocítico perivascular (43).

Se desconocen actualmente los mecanismos epileptogénicos del TND y del GG. Se plantea que el tumor por si solo es epileptogénico dadas sus características clinicopatológicas así como la irritación que provoca en la corteza que lo rodea, esto último es similar al de otros tumores glioneuronales (10). Otro elemento a tener en cuenta y que contribuye con la generación de las crisis, es su asociación con la DC, las que presentan su propia epileptogenicidad y que puede estar relacionada por la desorientación de las neuronas lo que conlleva a una disminución de las conexiones axodendríticas que interfieren con la sinaptogénesis (23, 39). Otros autores son de la opinión, que los tumores no son intrínsecamente epileptogénicos y que las crisis probablemente se originen en el tejido peritumoral (4).

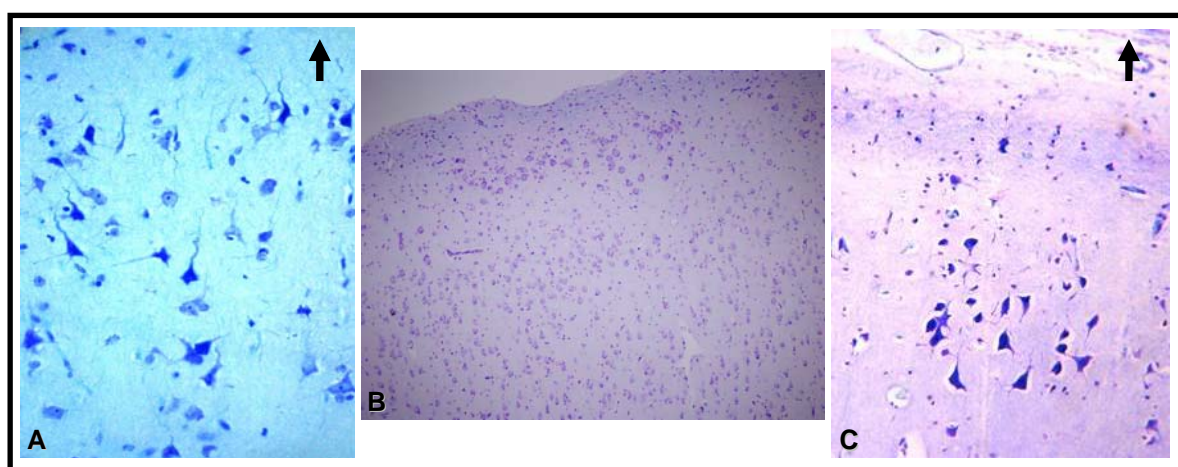


Figura 1. Displasia cortical focal. **A.** Dislaminación en capas II y III con neuronas mal orientadas (tipo IA). **B.** Dislaminación, neuronas gigantes en capa II, incremento del número de

células en capa I (tipo IB). C. Dislaminación, neuronas dismórficas en capa II (tipo IIA). Klüber-Barrera, A 20x; B 10 x; C 10x. La flecha indica la dirección de la superficie cortical.

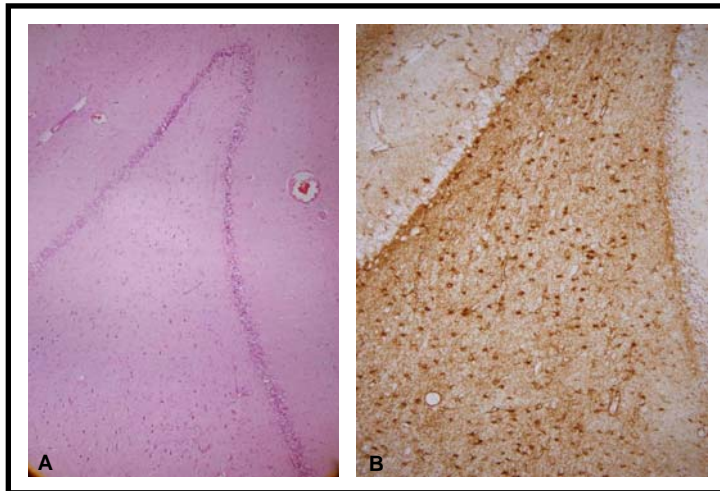


Figura 2. Esclerosis mesial del temporal. **A.** Pérdida neuronal en CA4. **B.** La misma área, marcada gliosis. **A.** Hematoxilina/Eosina, 4x. **B.** Proteína ácida gliofibrilar 10x.

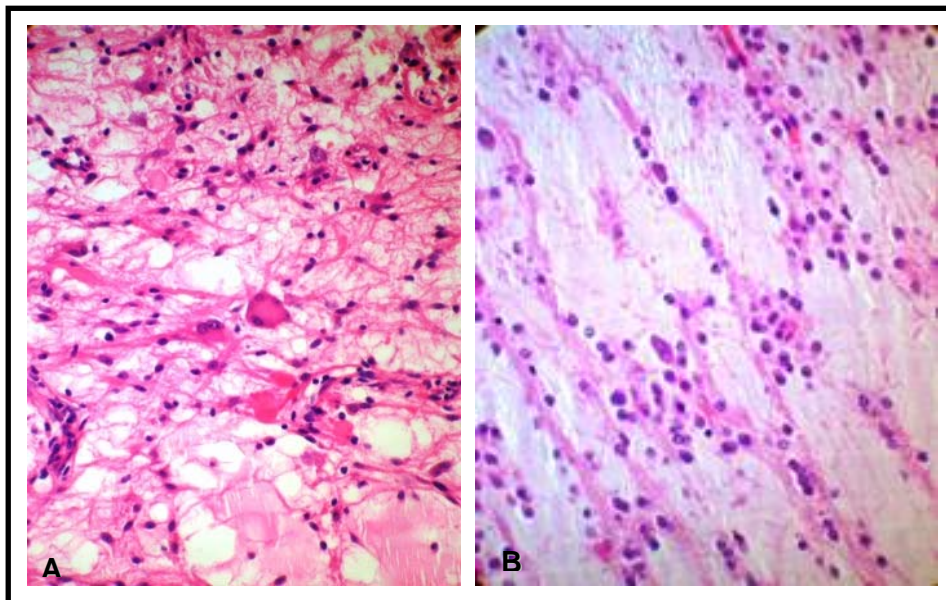


Figura 3. **A.** Ganglioglioma. Neuronas bi y multinucleadas, cuerpos granulares eosinófilicos, infiltrado linfocítico perivascular y cavidades microquísticas. **B.** Tumor neuroepitelial disembrionárico. Disposición columnar, perpendicular a la superficie cortical, presencia de neuronas flotando en lagos de mucinas, rodeadas por células "oligo-like". **A y B** Hematoxilina/Eosina 40X.

REFERENCIAS

1. Arai N. Cortical dysplasia in surgical pathology of intractable epilepsy. *Neuropathology* 1999; 19: 229-32.
2. Arai N, Takahashi T, Komori T, Yagishita A, Shimizu H. Diagnostic surgical neuropathology of intractable epilepsy. *Neuropathology* 2007; 27: 594-600.
3. Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. Classification system for malformations of cortical development. Update. *Neurology* 2001; 57: 2168-78.
4. Beaumont A, Whittle IR. The pathogenesis of tumour associated epilepsy. *Acta Neurochir* 2000; 142: 1-15.

5. Becker AJ, Wiestler OD, Figarella-Branger D, Blümcke I. Ganglioglioma and gangliocytoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. WHO classifications of tumours of the Central Nervous System. Lyon: IARC; 2007. p. 103-5.
6. Blümcke I, Lobach M, Wolf HK, Wiestler OD. Evidence for developmental precursor lesions in epilepsy-associated glioneuronal tumors. *Microsc Res Technol* 1999; 46: 53-58.
7. Blümcke I, Wiestler OD. Gangliogliomas: An intriguing tumor entity associated with focal epilepsies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61 (7): 575-84.
8. Bruton CJ. Pathological findings caused by seizures, with particular reference to the temporal lobe. In: Wieser HG, Elger CE, editors. Presurgical evaluation of epileptics. Berlin: Springer-Verlag; 1987. p. 71-8.
9. Bruton CJ. The neuropathology of temporal lobe epilepsy. New York: Oxford University Press; 1988.
10. Cascino GD. Epilepsy and brain tumors: implications for treatment. *Epilepsia* 1990; 31 (Suppl 3): S37-S44.
11. Cherian PJ, Radhakrishnan V, Radhakrishnan K. The significance of corpora amylacea in mesial temporal lobe epilepsy. *Neurol India* 2003; 51 (2): 277-9.
12. Chung MH, Horoupian DS. Corpora amylacea: a marker for mesial temporal sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 403-8.
13. Daumas-Duport C, Pietsch T, Hawkins C, Shankar SK. Dysembryoplastic neuroepithelial tumour. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. WHO classifications of tumours of the Central Nervous System. Lyon: IARC; 2007. p. 99-102.
14. Duggal N, Taylor R, Zou GY, Hammond RR. Dysembryoplastic neuroepithelial tumours: clinical, proliferative and apoptotic features. *J Clin Pathol* 2008; 61: 127-31.
15. Engel J, Jr. Surgery for seizures. *N Engl J Med* 1996; 334: 647-52.
16. Eriksson SH, Malmgren K, Nordborg C. Microdysgenesis in epilepsy. *Acta Neurol Scand* 2005; 111: 279-90.
17. Estupiñán-Díaz B, Morales-Chacón LM, Lorigados-Pedre L, García-Maeso I, Bender-del Busto JE, Trápaga-Quincoces O, et al. Hallazgos patológicos neocorticales en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal medial farmacorresistente sometidos a cirugía. *Rev Neurol* 2008; 46 (4): 203-9.
18. Foldvary-Schaefer N, Bautista J, Andermann F, Cascino G, Spencer S. Focal malformations of cortical development. *Neurology* 2004; 62: S14-S19.
19. Folkerth RD. Congenital malformations, perinatal diseases, and phacomatoses. In: Prayson RA, editor. *Neuropathology*. Churchill Livingstone: Elsevier; 2005. p. 95-180.
20. Giannini C, Paulus W, Louis DN, Liberski P. Pleomorphic xanthoastrocytoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. WHO classifications of tumours of the Central Nervous System. Lyon: IARC; 2007. p. 22-4.
21. Gil-Gouveia R, Cristino N, Farias JP, Trindade A, Ruivo NS, Pimentel J. Pleomorphic xanthoastrocytoma of the cerebellum: illustrated review. *Acta Neurochic* 2004; 146: 1241-44.
22. Hammond RR, Duggal N, Woulfe MJ, Girvin JP. Malignant transformation of a dysembryoplastic neuroepithelial tumor. *J Neurosurg* 2000; 92: 722-25.
23. Hong SC, Kang KS, Seo DW, Hong SB, Lee M, Nam DH, et al. Surgical treatment of intractable epilepsy accompanying cortical dysplasia. *J Neurosurg* 2000; 93: 766-73.
24. Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of human with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1990; 535: 195-204.
25. Kawamura T, Morioka T, Nishio S, Fukui K, Fukui M. Temporal lobe epilepsy and corpora amylacea in the hippocampus: clinicopathologic correlation. *Neural Res* 2002; 24: 563-69.
26. Lerner JT, Salamon N, Hauptman JS, Velasco TR, Hemb M, Wu JY, et al. Assessment and surgical outcomes for mild type I and severe type II cortical dysplasia: A critical review and the UCLA experience. *Epilepsia* 2009; 50 (6): 1310-35.
27. Loiseau H, Marchal C, Vital A, Vital C, Rougier A, Loiseau P. Occurrence of polyglucosan bodies in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55 (11): 1092-3.
28. Looney MR, Dohan FC, Davies KG, Seidenberg M, Hermann BP, Schweitzer JB. Synaptophysin immunoreactivity in temporal lobe epilepsy associated hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 98: 179-85.
29. Lubieniecki F, Gejman R, Taratuto AL. Patología de las epilepsias. En: Campos M, Kanner A. Eds. *Epilepsias. Diagnóstico y tratamiento*. Santiago: Mediterráneo; 2004. p.152-82.
30. Lurton D, Sundstrom, Brana C, Bloch B, Rougier A. Possible mechanisms inducing granule cell dispersion in humans with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1997; 26 (2): 351-61.

31. Luyken C, Blümcke I, Fimmers R, Urbach H, Wiestler OD, Schramm J. Supratentorial gangliogliomas: Histopathologic grading and tumor recurrence in 184 patients with a median follow-up of 8 years. *Cancer* 2004; 101: 146-55.
32. Mde CR, Barbosa-Coutinho L, Mugnol F, Hilbig A, Palmi A, da Costa LC, et al. Corpora amylacea in temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2003; 61: 942-45.
33. Meencke HJ, Janz D. Neuropathological findings in primary generalized epilepsy: A study of eight cases. *Epilepsia* 1984; 25: 8-21.
34. Mischel OS, Nguyen LP, Vinters HV. Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review on neuropathological features and proposal for a grading system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 137-54.
35. Nakamura M, Chiba K, Matsumoto M, Ikeda E, Toyama Y. Pleomorphic xanthoastrocytoma of the spinal cord. Case report. *J Neurosurg Spine* 2006; 5: 72-5.
36. Nishio S, Morioka T, Hisada K, Fukui M. Temporal lobe epilepsy: a clinicopathological study with special reference to temporal neocortical changes. *Neurosurg Rev* 2000; 23: 84-9.
37. Nishio S, Morioka T, Kawamura T, Fukui K, Nonaka H, Matsushima M. Corpora amylacea replace the hippocampal pyramidal cell layer in a patient with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2001; 42(7): 960-2.
38. Palmi A, Gambardella A, Andermann F, Dubeau F, da Costa JC, Olivier A, et al. Operative strategies for patients with cortical dysplastic lesions and intractable epilepsy. *Epilepsia* 1994; 35 (Suppl 6): S57-71.
39. Palmi A, Gambardella A, Andermann F, Dubeau F, da Costa JC, Olivier A, et al. Intrinsic epileptogenicity of human dysplastic cortex as suggested by corticography and surgical results. *Ann Neurol* 1995; 37: 476-87.
40. Palmi A, Lüders HO. Classification issues in malformations caused by abnormalities of cortical development. *Neurosurg Clin N Am* 2002; 37: 1-17.
41. Palmi A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Folvay-Schaefer N, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology* 2004; 62: S2-S8.
42. Pasquier B, Peoc'h M, Fabre-Bocquentin B, Bensaadi L, Pasquier D, Hoffmann D, et al. Surgical pathology of drug-resistant partial epilepsy. A 10-year experience with a series of 327 consecutive resections. *Epileptic Disord* 2002; 4 (2): 99-119.
43. Perry A. Glial and glioneuronal tumors. In: Prayson RA, editor. *Neuropathology*. Churchill Livingstone: Elsevier; 2005. p. 421-88.
44. Prayson RA, Estes ML, Morris HH. Coexistence of neoplasia and cortical dysplasia in patients presenting with seizures. *Epilepsia* 1993; 34 (4): 609-15.
45. Prayson RA, Estes ML. Cortical dysplasia: a histopathologic study of 52 cases of partial lobectomy in patients with epilepsy. *Hum Pathol* 1995; 26 (5): 493-500.
46. Prayson RA, Reith JD, Najm IM. Mesial temporal sclerosis. A clinicopathologic study of 27 patients, including 5 with co-existent cortical dysplasia. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120: 532-36.
47. Prayson RA, Spreafico R, Vinters HV. Pathologic characteristics of the cortical dysplasias. *Neurosurg Clin N Am* 2002; 37 (1): 17-25.
48. Prayson RA. Diagnostic challenges in the evaluation of chronic epilepsy-related surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* 2010; 34 (5): e1-e13.
49. Proper AE, Jansen GH, van Veelen CWM, van Rijen PC, Gispen WH, de Graan PNE. A grading system for hippocampal sclerosis based on the degree of hippocampal mossy fiber sprouting. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001; 101: 405-9.
50. Radhakrishnan A, Radhakrishnan K, Radhakrishnan VV, Paramban RM, Kesavadas C, Alexander A, et al. Corpora amylacea in mesial temporal lobe epilepsy: clinico-pathological correlations. *Epilepsy Res* 2007; 74: 81-90.
51. Sakuta R, Otsubo H, Nolan MA, Weiss SK, Hawkins C, Rutka JT, et al. Recurrent intractable seizures in children with cortical dysplasia adjacent to dysembryoplastic neuroepithelial tumor. *J Child Neurol* 2005; 20: 377-84.
52. Sawhney IMS, Lekhra OP, Shashi JS, Prabhakar S, Chopra JS. Evaluation of epilepsy management in a developing country: a prospective study of 407 patients. *Acta Neurol Scand* 1996; 94: 19-23.
53. Sisodiya SM. Surgery for malformations of cortical development causing epilepsy. *Brain* 2000; 123: 1075-91.

54. Sloviter RS, Zappone CA, Harvy BD, Bumanglag AV, Bender RA, Frotscher M. "Dormant basket cell" hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat. *J Comp Neurol* 2003; 459 (1): 44-76.
55. Streichenberger N, Ryvlin P, Guenot M, Sindou M, Kopp N, Mauguiere F. Polyglucosan bodies and temporal lobe epilepsy: an incidental finding or more? *Clin Neuropathol* 2001; 20: 172-5.
56. Takahashi A, Hong S-C, Seo DW, Hong SB, Lee M, Suh Y-L. Frequent association of cortical dysplasia in dysembryoplastic neuroepithelial tumor treated by epilepsy surgery. *Surg Neurol* 2005; 64: 419-27.
57. Tassi L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Lo Russo G, Mai R, et al. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain* 2002; 125 (Pt 8): 1719-32.
58. Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1971; 34: 369-87.
59. Valenti MP, Froelich S, Armspach JP, Chenard MP, Dietemann JL, Kerhli P, et al. Contribution of SISCO imaging in the presurgical evaluation of temporal lobe epilepsy related to dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Epilepsia* 2002; 43: 270-6.
60. Van Paesschen W, Revesz T, Duncan JS. Corpora amylacea in hippocampal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63: 513-5.
61. Watson C, Nielson SL, Cobb C, Burgerman R, Williamson B. Pathological grading system for hippocampal sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging-based volume measurements for the hippocampus. *J Epilepsy* 1996; 9: 56-64.
62. Wolf HK, Campos MG, Zentner J, Hufnagel A, Schramm J, Elger CE, et al. Surgical pathology of temporal lobe epilepsy. Experience with 216 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52 (5): 499-506.
63. Wyler AR, Dohan FC, Schweitzer JB, Berry III AD. A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy. *J Epilepsy* 1992; 5: 220-5.
64. Zentner J, Wolf HK, Ostertun B, Hufnagel A, Campos MG, Solymosi L, et al. Gangliogliomas: clinical, radiological, and histopathological findings in 51 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57 (12): 1497-1502.

CALIDAD DE VIDA EN EPILEPSIA

Bender del Busto JE, Morales-Chacón LM, González-González J, López-Pérez M.

Programa Cirugía de Epilepsia. Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN), La Habana, Cuba.

INTRODUCCIÓN

Se considera que la epilepsia es tan antigua como la humanidad misma y se puede presentar en cualquier persona sin distinción de edad, sexo, raza, país o características geográficas. Es uno de los trastornos del Sistema Nervioso Central más frecuentes (para algunos la segunda enfermedad neurológica) (5, 16, 22, 37) y a su vez una afección crónica caracterizada por crisis recurrentes de origen cerebral. Hipócrates la describe por primera vez en su libro *On the Sacred Disease* (25).

Las diferentes estadísticas consideran que la epilepsia afecta al 1-2% de la población; con una prevalencia de 8-17 epilépticos por 1000 habitantes. Además, que el 80% del total de pacientes epilépticos se controlan con tratamiento médico y que el 20% por lo tanto son médicamente intratables crónicos (57), así como que de ellos el 5-10% son candidatos a cirugía de la epilepsia (14, 44).

La resistencia farmacológica supone un importante problema para el paciente, con devastadoras consecuencias, que incluye persistencia de las crisis y morbilidad derivada de la epilepsia y de la medicación, aislamiento social, desempleo y disminución de la calidad de vida (2, 18).

Epilepsia refractaria o medicamento intratable es la que tiene ausencia de control satisfactorio de las crisis epilépticas, a pesar de un tratamiento médico adecuado con las dosis máximas toleradas (43). La ausencia de control satisfactorio, es igual a, insatisfactoria calidad de vida para el individuo, pues los efectos adversos indeseables son individuales. En estos pacientes además, se describe, un incremento en el riesgo de muerte súbita inexplicable (7), así como un importante costo

sanitario que se deriva del uso de nuevos y múltiples medicamentos y de una mayor necesidad de atención sanitaria (1, 34).

Algunos autores señalan que las tasas de mortalidad en casos refractarios a tratamiento médico para todas las causas son más bajas en niños de 1-14 años edad (4.1 muertes/1000 habitantes/años) y se incrementa con la edad/32.1 muertes por 1000 habitantes/años entre los 55-72 años) (40).

A su vez, la epilepsia crónica intratable por medicación antiepiléptica conlleva un pobre pronóstico, con una tasa de mortalidad de 1/200 habitantes/año como consecuencia directa de las crisis (14).

Por todo ello es que se considera que en estos pacientes la cirugía es una opción terapéutica, en los que el problema básico es la selección de los mismos, y tiene por objetivo mejorarles la calidad de vida a través del hecho de dejarlos libres de crisis. Sin embargo, se deben enfrentar los retos que se plantean con relación a este tratamiento que son: Definir una epilepsia médicamente intratable y la zona epileptógena, la relación de ésta con áreas funcionales adyacentes y el posible impacto sobre la calidad de vida después de una intervención quirúrgica exitosa (8). Al respecto de lo planteado, debemos analizar algunos aspectos relacionados con la patología epiléptica y su afectación con la calidad de vida.

CALIDAD DE VIDA EN EPILEPSIA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el término “calidad de vida” como una percepción del individuo de su posición en la vida en el contexto de la cultura y sistema de valores en el cual ellos viven y su relación con las metas, expectativas, estándares e intereses. Este concepto incluye la afectación de la salud física de la persona, su estado psicológico, su nivel de independencia, relaciones sociales y creencias personales (56).

Los análisis de calidad de vida, los aspectos sociales y laborales de los pacientes, deben estudiarse de forma diferente en los distintos países, pues cambian ampliamente la cultura, la educación, el nivel económico y el sistema sanitario, y con ello el nivel socioeconómico de estos. Las comparaciones se vuelven complicadas, y en función de las variantes citadas deberían validarse las modificaciones precisas de las herramientas de estudio.

Durante los últimos 150 años la humanidad ha logrado que muchas de las enfermedades transmisibles prácticamente hayan desaparecido. Los logros sanitarios y el desarrollo socioeconómico han permitido una considerable elevación del bienestar de la población. Gracias a esta evolución, en los países más desarrollados la esperanza de vida al nacer es superior a los 75 años, por lo que las comunidades han ido envejeciendo y la proporción de personas de la llamada tercera edad ya jubiladas es cada vez mayor. Paralelamente a este proceso de mejora de la expectativa de vida y de la disminución de los procesos patológicos transmisibles, han ido en aumento las enfermedades crónicas, entre las que ocupan un lugar destacado las neurológicas. Por fortuna estos procesos no desencadenan la muerte de las personas afectadas, pero desgraciadamente deterioran su salud, su capacidad de disfrutar de la vida y, por ende, su calidad de vida (23).

Entre las enfermedades crónicas no transmisibles que afectan la calidad de vida de los pacientes está la epilepsia, con mayor afectación en la de difícil control con los fármacos antiepilépticos, en los que se determina la cirugía, con el objetivo no solo de la reducción de las crisis, sino por los demás beneficios vitales que conlleva ello (50).

Como un trastorno crónico, la epilepsia tiene un considerable impacto en la salud de los pacientes, relacionada con la calidad de vida y acompañada de limitaciones físicas y psicosociales de los individuos (47).

Las consecuencias de la epilepsia en términos de morbilidad, mortalidad, calidad de vida y estigma, difieren en todo el mundo, dependiendo de la cultura, la economía y las diferentes comunidades (32).

Merecen ser analizados algunos factores que se relacionan con la afectación de la calidad de vida en el paciente epiléptico.

Hay que significar que el estigma asociado a la epilepsia y la discriminación social, causa significativamente más sufrimiento en pacientes con epilepsia, que las crisis mismas, lo cual ha acompañado a esta población de pacientes durante siglos y en la mayor parte de regiones del planeta. El concepto de estigma es descrito como un atributo de profunda desacreditación y en el caso de la epilepsia, conlleva a que cada paciente epiléptico sea muy lábil (32).

Para la mayoría de los autores, está bien establecido que la epilepsia activa puede tener un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes y que los síntomas de depresión y preocupación por las crisis, tienen particular importancia en ello (24).

Además de la experiencia de las crisis y el deterioro de las funciones cognitivas, particularmente la memoria (53), los pacientes sufren reacciones adversas de las drogas antiepilépticas, así como dificultades psicosociales tales como el estigma que los aparta de la sociedad y sienten la experiencia de pérdida de su status y discriminación social (35).

El efecto en la salud psicosocial de la epilepsia activa y el incremento de las crisis está bien documentado (4, 12, 27, 33, 45) y se sugiere que aun pequeñas disminuciones en la frecuencia de las crisis podrían tener un dramático impacto en la calidad de vida (33).

El tratamiento con medicación antiepiléptica tiende a que la mayoría de los pacientes estén libres de crisis y este tenga estrecha relación con la elevación de la calidad de vida, por lo cual es un factor indirecto determinante de esta. Sin embargo, los positivos efectos de las drogas antiepilépticas (DAE) en el control de las crisis son contrarrestados por los potenciales efectos adversos, los cuales reducen la calidad de vida en dichos pacientes, lo cual es muy común (41).

Estos fenómenos adversos de las DAE, que pueden clínicamente ser determinantes en la evolución, son más frecuentes en pacientes con epilepsia refractaria (29).

La comorbilidad también tiene un papel importante en la calidad de vida del paciente epiléptico. Pulsipher y colaboradores estudiaron la calidad de vida en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal y reportaron la presencia de comorbilidad médica, psiquiátrica o ambas. La más común entre las comorbilidades medicas fueron las enfermedades cerebrovasculares, respiratorias y endocrinas. Las patologías psiquiátricas más comunes fueron la ansiedad y los trastornos del humor. Estos autores relacionaron el incremento del número de comorbilidades con el detrimento de la calidad de vida (42).

Es alta la prevalencia de las dos comorbilidades más comunes: la ansiedad y la depresión según otros investigadores (19, 20).

Se acepta, como ya se ha expresado, progresivamente la idea de que el número de crisis no es el único dato determinante del estado de un paciente epiléptico, aunque probablemente sea el principal factor.

La intensidad de las crisis, el momento de aparición de las mismas, la percepción que el paciente tenga de las crisis sufridas, o los efectos secundarios de una medicación aparentemente beneficiosa, pueden modificar sustancialmente el supuesto beneficio derivado del factor principal.

Por ello, junto a la consideración de los datos clínicos esenciales se ha introducido cada vez más la valoración de la llamada calidad de vida. Este término, de significación sociológica, es realmente una moda, y en este sentido ha sido valorado por algunos autores en debates recientes. Sin embargo, hay que distinguir entre la valoración puramente sociológica de la calidad de vida y las modificaciones de la calidad de vida inducidas por una enfermedad, en nuestro caso la epilepsia. Planteada de este modo, la valoración de la calidad de vida adquirirá categoría de instrumento de valoración clínica de primer orden, a la vez que ayuda a establecer de modo práctico unos criterios más exigentes y amplios en la valoración de los fármacos antiepilépticos (9, 11).

El fundamento de la mayoría de los métodos de medida de la calidad de vida en epilepsia ha sido claramente postulado por Devinsky y Cramer: 'La calidad de vida es un concepto subjetivo'. Sobre esta base, se han elaborado cuestionarios, a los que contesta directamente el enfermo, y que tratan de reflejar, con la mayor fidelidad posible, el punto de vista del enfermo sobre su propia calidad de vida.

La calidad de vida en relación con la salud (CVRS), el empleo, la educación, las actividades sociales y en general, las limitaciones de la reintegración social, mermadas por la epilepsia refractaria, son los verdaderos objetivos de los pacientes que deciden operarse, pues los mismo frecuentemente se encuentran afectados (10). Mientras que los factores físicos, tales como la frecuencia de las crisis, pueden ser controladas mejor con el tratamiento, los factores sicosociales son más difíciles de manejar (36).

En los pacientes con epilepsia, la calidad de vida está relacionada con varios factores, entre los que se incluyen la frecuencia y severidad de las crisis y la toxicidad de las DAE, entre otros (48).

Por todo ello, no es la reducción de las crisis el objetivo principal de la intervención quirúrgica (6).

Varios investigadores consideran que a la hora de evaluar estos aspectos en los pacientes operados se encuentran resultados contradictorios en la bibliografía.

Según Vickrey y sus colaboradores (49), existe una relación directa entre el grado de control de las crisis y la CVRS. Pero si comparamos pacientes con epilepsia refractaria no operados y operados (51), solamente se aprecian mejorías discretas sin significación estadística en la CVRS en la evolución de ambos grupos a favor del quirúrgico, a pesar de una clara disminución de las crisis en estos.

Por fortuna, los resultados no son siempre tan ambiguos. Disponemos de trabajos en los que se encuentran mejorías significativas en los aspectos sociales y económicos que rodean al paciente (3, 26, 46, 55).

Ante las llamativas divergencias en los resultados publicados, Dodrill y colaboradores (13) revisaron 17 estudios que analizaban el impacto psicosocial de la cirugía de la epilepsia; y encontraron que en dos terceras partes de los casos se objetivaba mejoría en las relaciones interpersonales. Los aspectos psicosexuales y psicosociales mejoraban en la mayoría de los pacientes. También observaron mejorías en los ámbitos vocacional y laboral de los pacientes, aunque los criterios de empleo en varios trabajos incluían actividades no remuneradas o remuneradas pero en el domicilio de los pacientes.

Los resultados positivos se limitaban a los pacientes sin crisis o muy bien controlados. Aunque, de ellos, los pacientes con trastornos psiquiátricos o cognitivos, y los que permanecieron desempleados durante un periodo prolongado antes de la cirugía, en raras ocasiones consiguieron empleos estables. Apenas encontraron trabajos en los que se describiera la impresión global de los pacientes con respecto a los resultados de la cirugía a que se habían sometido. En general, tras operarse reconocían la disminución significativa de las crisis.

Para obtener una clara mejoría de la calidad de vida tras la cirugía de la epilepsia del lóbulo temporal, probablemente los pacientes deberían operarse antes, considerando que tras dos años de intentos terapéuticos adecuados, una epilepsia puede considerarse ya farmacorresistente, y que la morbimortalidad del tratamiento quirúrgico es asumible en gran parte de los casos (9, 38).

La indicación quirúrgica viene apoyada no sólo por la epilepsia refractaria que teóricamente provoca, sino por el potencial de amenaza que esta lesión tenga para la calidad de vida del paciente (21).

Dupont y colaboradores en su serie demuestran el beneficio a largo plazo de la cirugía del lóbulo temporal. Se describe una significativa y persistente ganancia en la función psicosocial después de la cirugía. Aún sin una completa ausencia de crisis, la mayoría de los pacientes reportan cambios positivos en los resultados psicosociales (15).

Según la literatura revisada, se alcanza como conclusión que ausencia de crisis epilépticas es similar a buena calidad de vida y ello no en todos los casos se logra con la medicación antiepiléptica, por lo cual la necesidad de la cirugía (28, 31).

Este proceder tiende a ser superior a la medicación antiepiléptica, según estudios controlados y prospectivos, no sólo en relación al control de las crisis, sino también al respecto de la calidad de vida (54).

Las escalas *QOLIE*, desarrolladas principalmente por Devinsky y Cramer, han pretendido ser la síntesis simplificada de las usadas hasta el momento. Desarrolladas y validadas en un estudio multicéntrico desde 1991, por el *QOLIE Development Group*, se orientaron como escalas de calidad de vida relativamente abiertas, no sólo relacionadas con la salud (9).

Se basan en datos proporcionados por el paciente y por su allegados, en respuesta a un cuestionario de 98 preguntas, de las que se han derivado tres instrumentos, todos ellos validados: la *QOLIE-89*, que comprende 17 escalas para el seguimiento de sus pacientes y mejor evaluación de efecto de los fármacos, dedicado solamente a investigación, especialmente a ensayos clínicos; la *QOLIE-31*, que incluye 7 escalas, dedicado al uso de expertos en epilepsia, principalmente para el seguimiento de pacientes, aunque puede ser también un útil instrumento de investigación y la *QOLIE- 10*, instrumento simple, de fácil uso, para personas no especializadas, que pretenden tener una referencia rápida, aunque bastante inespecífica, de la calidad de vida de un paciente. Validada en más de 300 pacientes, en 25 centros, es probablemente la escala que ha alcanzado mayor difusión, y que ha sido aceptada como válida, sensible y fiable por más neurólogos, e incluida en más ensayos clínicos de los últimos años (11).

Estudios recientes, usando otros métodos (cuestionario ESI-55) establecidos por Vickrey y colaboradores previamente, mostraron resultados significativamente mejores en pacientes con tres o más años de operados (39, 52).

Los beneficios prospectivos de la cirugía en la epilepsia, comparados con los tratamientos conservadores, han sido descritos en estudios prospectivos por Wiebe (54).

Algunos estudios recientes apoyan la idea de que la intervención quirúrgica temprana puede ser beneficiosa en la calidad de vida de los pacientes y la mejoría de las funciones cognitivas y su incorporación social (30).

Coincidimos con estos autores en que al establecerse el diagnóstico de epilepsia y el criterio de refractariedad, debe evaluarse tempranamente la decisión quirúrgica, con el fin de reducir la frecuencia de las crisis epilépticas y la sintomatología relacionada con estas, así como un incremento de la calidad de vida.

La Academia Americana de Neurología recomendó la cirugía como el tratamiento de choque en la epilepsia del lóbulo temporal médicamente refractaria desde el año 2003 y con ello la mejoría de la calidad de vida de los pacientes afectados (17).

CONCLUSIONES

La epilepsia es una enfermedad crónica que lleva implícita la reducción de la calidad de vida del paciente y por ende la necesidad del manejo multifactorial, debiendo hacerse un llamado a la mayor comprensión de las intervenciones psicosociales con inclusión de programas en la comunidad para reducir el estigma y débil condición del paciente (32).

REFERENCIAS

1. Argumosa A, Herranz JL. La repercusión económica de las enfermedades crónicas: el costo de la epilepsia infantil en el año 2000. *Bol Pediatr* 2001; 41:23-9.
2. Arroyo S, Brodie MJ, Avanzini G, Baumgartner C, Chiron C, Dulac O, et al. Is refractory epilepsy preventable? *Epilepsia* 2002 Apr; 43(4):437-44.
3. Augustine EA, Novelly RA, Mattson RH, Glaser GH, Williamson PD, Spencer DD, et al. Occupational adjustment following neurosurgical treatment of epilepsy. *Ann Neurol* 1984 Jan;15(1):68-72.
4. Baker GA, Jacoby A, Buck D, et al: Quality of life of people with epilepsy: a European study. *Epilepsia* 1997; 38(3): 353-62.
5. Bender del Busto JE, Morales Chacón L, García Maeso I, García Navarro ME. Evaluación clínica pre y posquirúrgica de pacientes con epilepsia refractaria del lóbulo temporal. *Rev Mex Neuroci* 2006; 7(2):112-9.

6. Bien CG, Schulze-Bonhage A, Soeder BM, Schramm J, Elger CE, Tiemeier H. Assessment of the long-term effects of epilepsy surgery with three different reference groups. *Epilepsia* 2006 Nov; 47(11):1865-9.
7. Brodie MJ. Diagnosing and predicting refractory epilepsy. *Acta Neurol Scand Suppl* 2005; 181:36-9.
8. Burgeois BFD. Establishment of pharmacoresistancy. In: Wolf P, editor. *Epileptic seizures and syndromes*. London: John Libbey; 1994. p. 591-8.
9. Cramer JA, Perrine K, Devinsky O, Bryant-Comstock L, Meador K, Hermann B. Development and cross-cultural translations of a 31-item quality of life in epilepsy inventory. *Epilepsia* 1998 Jan; 39(1):81-8.
10. Chin PS, Berg AT, Spencer SS, Sperling MR, Haut SR, Langfitt JT, et al. Employment outcomes following resective epilepsy surgery. *Epilepsia* 2007 Dec; 48(12):2253-7.
11. Devinsky O, Cramer A. Introduction: quality of life in epilepsy. *Epilepsia* 1993; 34 Suppl 4:51-53.
12. Djibuti M, Shakarishvili R. Influence of clinical, demographic, and socioeconomic variables on quality of life in patients with epilepsy: findings from Georgian study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2003; 74(5): 570-3.
13. Dodrill CB, Batzel LW, Fraser RT. Surgical outcome: psychosocial changes. In: Luders H, editor. *Surgery for epilepsy*. New York: Raven Press; 1991. p. 661-8.
14. Duncan JS, Shorvon SD, Fish DR. *Clinical Epilepsy*. London: Churchill Livingstone; 1995.
15. Dupont S, Tanguy ML, Clemenceau S, Adam C, Hazemann P, Baulac M. Long-term prognosis and psychosocial outcomes after surgery for MTLE. *Epilepsia* 2006 Dec; 47(12):2115-24.
16. Engel J, Jr. Surgery for seizures. *N Engl J Med* 1996 Mar 7; 334(10):647-52.
17. Engel J, Jr., Wiebe S, French J, Sperling M, Williamson P, Spencer D, et al. Practice parameter: temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, in association with the American Epilepsy Society and the American Association of Neurological Surgeons. *Neurology* 2003 Feb 25; 60(4):538-47.
18. French JA. Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia* 2007; 48 Suppl 1:3-7.
19. Gaitazis A, Trimble MR, Sander JW. The psychiatric comorbidity of epilepsy. *Acta Neurol Scand* 2004; 110(4): 207-20.
20. Gilliam F, Kanner AM. Treatment of depressive disorders in epilepsy patients. *Epilepsy Behav* 2002; 3(5): 52-9.
21. García de Sola R. Cirugía de la epilepsia: procedimientos quirúrgicos. In: Sociedad Española de Neurología. *Liga Española Contra la Epilepsia*, editor. *Epilepsia*. Madrid: Ergon; 2003. p. 509-34.
22. Hauser WA, Hesdorffer DC. *Epilepsy: frequency, causes and consequences*. New York: Demos Press; 1990.
23. Hernández Mejía R, Fernández López JA, Rancaño García I. Epidemiología y calidad de vida: comparación entre variables sociodemográficas. In: Gil V, Merino J, Quirce F, Orozco D, editors. *Investigación y práctica clínica*. Madrid: Gráficas Robel; 1999. p. 249-59.
24. Hessen E, Lossius MI, Gjerstad L. Health concerns predicts poor quality of life in well-controlled epilepsy. *Seizure* 18 (2009) 487-491.
25. Hippocrates. *The sacred disease*. Cambridge: Harvard University; 1923.
26. Huber Z. The critical evaluation of the late results after temporal lobectomy performed because of medically refractory complex partial epilepsy (CPE). *Zentralbl Neurochir* 1990; 51(2):78-81.
27. Jacoby A, Baker GA, Steen N, et al. The clinical course of epilepsy and its psychosocial correlates: findings from a UK Community study. *Epilepsia* 1996; 37(2): 148-61.
28. Jacoby A, Baker GA. Quality-of-life trajectories in epilepsy: a review of the literature. *Epilepsy Behav* 2008 May; 12(4):557-71.
29. Jacoby A, Snape D, Baker GA. Determinants of quality of life in people with epilepsy. *Neurol Clin* 27 (2009) 843-863.
30. Jeong SW, Lee SK, Hong KS, Kim KK, Chung CK, Kim H. Prognostic factors for the surgery for mesial temporal lobe epilepsy: longitudinal analysis. *Epilepsia* 2005 Aug; 46(8):1273-9.
31. Kobau R, Zahran H, Grant D, Thurman DJ, Price PH, Zack MM. Prevalence of active epilepsy and health-related quality of life among adults with self-reported epilepsy in California: California Health Interview Survey, 2003. *Epilepsia* 2007 Oct; 48(10):1904-13.
32. Kumari P, Ram Daya, Nizamie SH, Goyal N. Stigma and quality of life in individuals with epilepsy: A preliminary report. *Epilepsy & Behavior* 15 (2009) 358-361.

33. Leidy NK, Elixhauser A, Vickrey B, et al. Seizure frequency and the health-related quality of life of adults with epilepsy. *Neurology* 1999; 53: 162-6.
34. Leppik IE. Intractable epilepsy in adults. *Adv Exp Med Biol* 2002; 497:1-7.
35. Link, BG, Phelan JC. Stigma and its public health implications. *Lancet*, 2006. 367, 528-529.
36. Lim YJ, Chan SY, Ko Y. Stigma and health-related quality of life in Asian adults with epilepsy. *Epilepsy Research* (2009) 87, 107-119.
37. Maroun F, Fitzgerald W, Rasmussen T, Jacob JC, Sadler M, Murray G. Historical vignette: cerebral cortical stimulation and surgery for epilepsy. *Can J Neurol Sci* 1996 Nov; 23(4):303-7.
38. Mc Lachlan RS, Rose KJ, Derry PA, Bonnar C, Blume WT, Girvin JP. Health-related quality of life and seizure control in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1997 Apr; 41(4):482-9.
39. Mikati MA, Comair YG, Rahi A. Normalization of quality of life three years after temporal lobectomy: a controlled study. *Epilepsia* 2006 May; 47(5):928-33.
40. Patwardhan RV, Mathern GW. Surgical treatment of therapy resistant epilepsy. *Continuum* 2004;10(4):100-18.
41. Perucca P, Carter J, Vahle V, et al. Adverse antiepileptic drug effects: towards a clinically and neurobiologically relevant taxonomy. *Neurology* 2009; 72(14): 1223-9.
42. Pulsipher DT, Seidenberg M, Jones J, et al. Quality of life and comorbid medical and psychiatric conditions in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2006; 9(3): 510-4.
43. Reynolds E. Mechanism of intractability. In: Wolf P, editor. *Epileptic seizures and syndromes*. London: John Libbey; 1994. p. 599-604.
44. Sander JW. The problem of the drug resistant epilepsies. *Novartis Found Symp* 2002;(243):4-12.
45. Senol V, Soyuer F, Arman F, et al. Influence of fatigue, depression, and demographic, socioeconomic, and clinical variables on quality of life of patients with epilepsy. *Epilepsy Behav* 2007; 10(1): 96-104.
46. Taylor DC, Falconer MA. Clinical, socio-economic, and psychological changes after temporal lobectomy for epilepsy. *Br J Psychiatry* 1968 Oct; 114(515):1247-61.
47. Testa, MA, Simonson, DC, 1996. Assessment of quality of life outcomes. *N. Engl. J. Med.* 334,835-840.
48. Theodore WH, Spencer SS, Wiebe S, Langfitt JT, Ali A, Shafer PO, et al. Epilepsy in North America: a report prepared under the auspices of the global campaign against epilepsy, the International Bureau for Epilepsy, the International League Against Epilepsy, and the World Health Organization. *Epilepsia* 2006 Oct;47(10):1700-22.
49. Vickrey BG, Hays RD, Graber J, Rausch R, Engel J, Jr., Brook RH. A health-related quality of life instrument for patients evaluated for epilepsy surgery. *Med Care* 1992 Apr;30(4):299-319.
50. Vickrey BG, Hays RD, Herman BP, Bladin PF, Batzel LW. Outcomes with respect to quality of life. In: Engel J, Jr., editor. *Surgical treatment of the epilepsies*. 2 ed. New York: Raven Press; 1993. p. 623-35.
51. Vickrey BG, Hays RD, Engel J, Jr., Spritzer K, Rogers WH, Rausch R, et al. Outcome assessment for epilepsy surgery: the impact of measuring health-related quality of life. *Ann Neurol* 1995 Feb; 37(2):158-66.
52. Vickrey BG. A procedure for developing a quality-of-life measure for epilepsy surgery patients. *Epilepsia* 1993;34 Suppl 4:522-527.
53. Vingerhoets, G., 2006. Cognitive effects of seizures. *Seizure* 15, 221-226.
54. Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med* 2001 Aug 2; 345(5):311-8.
55. Williams KL, Roth DL, Kuzniecky R, Faught E, Morawetz R. Psychosocial outcome following temporal lobe surgery. *J Epilepsy* 1994;7: 144-51.
56. World Health Organisation Quality of Life Group. What quality of life? World Health Organisation quality of life assessment. *World Health Forum* 1996; 17(4): 354-6.
57. Zimmerman RS, Sirven JI. An overview of surgery for chronic seizures. *Mayo Clin Proc* 2003 Jan; 78(1):109-17.

ASPECTOS ECONÔMICOS DAS EPILEPSIAS

de Albuquerque M, Scorza FA.

Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Disciplina de Neurologia Experimental, Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina. São Paulo. Brazil.

INTRODUÇÃO

A epilepsia constitui um problema neurológico crônico grave e acarreta uma carga econômica enorme para a sociedade. Tem havido muitos avanços na epileptologia clínica nos últimos anos, com a disponibilidade de novas drogas antiepiléticas (DAEs), com o uso do implante do estimulador vagal e com o estabelecimento da cirurgia como uma opção segura e efetiva para o tratamento das epilepsias refratárias (Langfitt, 2000; Beghi e col., 2008; Strzelczyk e col., 2008).

Em todos os sistemas de saúde ao redor do mundo existe um interesse crescente nos aspectos econômicos da saúde e seus cuidados. Para muitas doenças, inclusive as epilepsias, há poucas informações sobre os custos dos programas de tratamento, a possibilidade de conseguir evoluções clínicas semelhantes com o menor custo e o custo/benefício dos novos tratamentos (Heaney e Begley, 2002).

Nas últimas duas décadas têm sido reconhecidas cada vez mais a importância de se considerar as implicações econômicas dos tratamentos prescritos; além de que, também deve ser levada em consideração a melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Desde os primeiros estudos da farmacoeconomia das epilepsias, o número de publicações vem aumentando substancialmente, principalmente com foco nas novas DAEs, muito mais caras que as DAEs clássicas (Van Hout e col., 1997); tanto que, em 1996 foi estabelecida uma comissão para investigar os aspectos econômicos das epilepsias (Beran e Pachlatko, 1997).

Os aspectos psicossociais, cognitivos e sexuais das epilepsias têm recebido muito mais atenção e, portanto, a melhora da qualidade de vida tem se tornado o foco principal no tratamento dos pacientes com epilepsia (Thomas, 2000). Os avanços nos tratamentos trazem inevitavelmente aumentos nos custos e os médicos têm pouco ou nenhum conhecimento relativo à farmacoeconomia, que é uma disciplina relativamente nova nas ciências da saúde.

CÁLCULO DO CUSTO DAS EPILEPSIAS

Na avaliação socioeconômica, os custos são os recursos gastos para se obter um desejado estado de saúde e, tanto os gastos médicos quanto os não médicos, dirigidos para a prevenção, diagnóstico, tratamento e reabilitação devem ser incluídos.

O termo custo refere-se ao valor econômico de recursos, consumidos ou não, produzidos em decorrência de uma doença. O custo estimado para as epilepsias pode ser bastante variável, de acordo com três fatores: diagnóstico, perspectiva e atribuição de custos em casos de co-morbidades.

Há uma grande variedade de modelos para o cálculo do custo das epilepsias. Inicialmente podem ser divididos, pelo ponto de vista da perspectiva, em dois tipos: o dos que tem como base a incidência ou a prevalência. No primeiro caso o custo da epilepsia para toda a vida do indivíduo é calculado como o produto da incidência e do gasto médio do indivíduo durante o tempo da doença. Nos estudos do segundo tipo, por sua vez, calcula-se o custo anual da epilepsia como o produto da prevalência e do gasto médio para diferentes grupos de pacientes durante o período de um ano (Begley e Beghi, 2002). Esses cálculos geralmente consideram os custos diretos e indiretos das epilepsias. Uma dificuldade associada é a de que o diagnóstico etiológico das síndromes epiléticas e a identificação de custos associados são muito variáveis, pois as crises epiléticas frequentemente podem ocorrer como sinais ou sintomas de outras doenças.

CUSTOS MÉDICOS DIRETOS, INDIRETOS E INTANGÍVEIS DAS EPILEPSIAS REFRACTÁRIAS

As epilepsias acarretam uma carga econômica enorme para a sociedade, sendo que os principais componentes são os custos indiretos, decorrentes da baixa produtividade. Com o tratamento efetivo, cerca de 70% dos pacientes entram em remissão, e pode ser efetivamente reabilitados, o que leva a um balanço econômico positivo.

As considerações econômicas são particularmente importantes para pacientes com crises epilépticas refratárias ao tratamento. Cerca de 20 a 30% dos pacientes não respondem aos tratamentos e, embora constituam a menor parte dos pacientes, são responsáveis por um alto custo econômico e social. Jacoby e col. (1998) relataram que o custo relativo das epilepsias refratárias pode ser até oito vezes maior que o custo relativo da epilepsia controlada; os custos indiretos são particularmente altos e incluem a perda da produtividade por desemprego, subemprego, mortalidade, absenteísmo e perda de dias de trabalho de amigos ou parentes que cuidam do paciente.

Embora todos os pacientes refratários possam ser tratados clinicamente, alguns de les podem responder bem ao tratamento cirúrgico; em consequência, com o melhor controle das crises, podem diminuir o uso dos recursos de cuidados com a saúde, com menor número de consultas médicas, testes diagnósticos e hospitalizações. Embora a cirurgia seja um procedimento caro, pode levar a uma diminuição dos custos indiretos, caso as crises tenham sido a principal causa de menor produtividade.

Os custos médicos diretos incluem os decorrentes da avaliação médica e do tratamento; os custos não médicos diretos incluem a educação especial, transporte e atendimento domiciliar nos casos de coexistência de déficits neurológicos.

Os custos intangíveis, por fim, são os de caráter social e psicológico, como pior qualidade de vida, isolamento social, estigma, dor e insatisfação pessoal (Thomas, 2000). Embora esses aspectos não sejam mensuráveis, pesquisas recentes têm usado as medidas de avaliação da qualidade de vida para estimar o impacto da epilepsia no bem-estar emocional. Eles se relacionam à sensação de bem-estar em associação com a melhora da saúde e vice-versa. São descritos como intangíveis pela

dificuldade de serem avaliados quantitativamente. De qualquer forma, numa condição crônica como a epilepsia, frequentemente estigmatizante, esse custo pode ser significativo (Heaney e Begley, 2002).

Os custos indiretos podem dar origem a confusões, pois as crianças e idosos, que comumente não trabalham, possuem um custo indireto mais baixo (Begley e Beghi, 2002). Além disso, os cuidados com a saúde, os diagnósticos, a terapêutica e as necessidades das crianças e adultos com epilepsia são diferentes, o que implica em diferenças de custos, sendo que, geralmente nas fases precoces da vida os custos mais altos são os diretos (Argumosa e Herranz, 2004).

O cálculo dos custos indiretos deve envolver uma avaliação minuciosa do impacto da epilepsia na vida socioeconômica dos pacientes e de seus familiares.

TRATAMENTO EM PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO

Os países em desenvolvimento e os países desenvolvidos têm importantes diferenças geográficas, econômicas e sociais: a prevalência e incidência das epilepsias são mais altas nos países em desenvolvimento; entretanto, nos países desenvolvidos, a despeito da alta incidência, a prevalência é relativamente baixa, talvez decorrente da alta mortalidade dos pacientes com epilepsia (Carpio e Hauser, 2009). Como o fenobarbital e a fenitoína são os medicamentos mais facilmente encontrados e de mais baixo custo, são as DAEs mais frequentemente utilizadas nos países em desenvolvimento.

As epilepsias constituem o maior problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e a maioria das pessoas com epilepsia que moram nesses países, muitas vezes ficam sem diagnóstico e sem tratamento regular (Tran e col., 2007; Radhakrishnan, 2009), além de ter o fornecimento e a distribuição das DAEs de forma bastante irregular (Chisholm, 2005). Nesses países a carga econômica do custo/efetividade dos tratamentos para os pacientes com epilepsias refratárias é muito importante (Radhakrishnan, 2009).

A análise do custo/benefício é bastante variável, pois os gastos com os tratamentos medicamentoso e cirúrgico são muito diferentes nas diversas regiões geográficas (Rao e Radhakrishnan, 2000; Hong e col., 2009; Meyer e col., 2010).

Embora o tratamento cirúrgico seja caro, é mais factível se comparado ao tratamento clínico de longa duração (Platt e Sperling, 2002), pois a possibilidade de o paciente ficar livre das crises após a córtico-amigadalo-hipocampectomia é de cerca de 70%, com 30% de possibilidade de ficar sem medicamentos após três anos decorridos do procedimento cirúrgico. A experiência de um centro terciário para o tratamento das epilepsias, localizado em um país em desenvolvimento, mostra que a cirurgia não apenas é possível, mas é a melhor opção do ponto de vista econômico (Rao e RadhaKrishan, 2000). Tanto o procedimento cirúrgico quanto a estimulação vagal frequentemente envolvem custos iniciais altos, mas podem resultar em economia nos pacientes tratados com sucesso, que vão requerer baixa utilização dos serviços médicos e das DAEs (Heaney e Begley, 2002).

Em muitos países em desenvolvimento, as escolhas feitas pelos médicos para os métodos de investigação e tratamento dependem muitas vezes da capacidade econômica do paciente para arcar com esses custos. Em países com sistemas sociais e de saúde bem desenvolvidos, os tratamentos ou são gratuitos ou são subsidiados pelos governos; nesses locais, a prescrição de DAEs mais caras pode ser limitada apenas pela aprovação de formulários fornecidos pelos governos para esquema de reembolso (Gordon e col., 1996; Fisher e col., 2000; Heaney e col., 2002, Yoon et al., 2009).

EFEITOS ADVERSOS E MÁ ADERÊNCIA

Por má aderência entendemos o não cumprimento das orientações da equipe de saúde. A taxa de não aderência ao tratamento antiepiléptico é de aproximadamente 39%, o que aumenta o número de internações e, conseqüentemente os custos dos tratamentos (Davis e col., 2008). Os pacientes e seus familiares deverão ser orientados nesse sentido, pois além da diminuição da morbi-mortalidade teremos diminuição do número de internações.

Geralmente os estudos de farmacoeconomia incluem os custos decorrentes das internações e tratamentos farmacológicos, sendo que poucos estudos calculam os custos dos efeitos adversos das DAEs ou do próprio tratamento das crises (Cockerell et al., 1994a; Murray et al., 1996). A atribuição de custos relativos à ocorrência de efeitos adversos é de difícil avaliação. O tratamento de efeitos colaterais graves pode

ser uma fonte relevante de custos para o paciente com epilepsia e pode representar a maior diferença de custo entre as novas drogas e as convencionais (Hughes e Cockerell, 1996) e a introdução de uma nova droga, mais efetiva e com pouco ou nenhum efeito adverso, pode estar associada a um custo menor (Markowitz e col., 1998). Embora os custos das consultas com os epileptologistas sejam incluídos, geralmente os atendimentos com os médicos da atenção primária da saúde não são quantificados, assim como as consultas com outros especialistas. O gasto com a realização de testes diagnósticos também é bastante variável, embora os exames mais caros geralmente sejam computados, como a tomografia cerebral, ressonância magnética, tomografia por emissão de fóton único, video-eletrencefalograma e dosagens sanguíneas das DAEs.

Além disso, apesar de muitos estudos avaliarem os custos indiretos dos próprios pacientes, nenhum avalia as consequências ocupacionais dos outros membros da família.

Outro importante aspecto a ser considerado é a avaliação dos índices de mortalidade, pois as pessoas com epilepsia têm um risco 2 a 3 vezes maior quando comparados com a população geral (Cockerell et al., 1994b; Scorza et al., 2010a; Scorza et al., 2010b).

DIFICULDADES ECONÔMICAS DAS EPILEPSIAS PARA O PACIENTE

Quando se consideram os aspectos econômicos das epilepsias, o foco geralmente recai sobre o custo do tratamento, incluindo comparações entre as relações custo/benefício das diferentes DAEs.

A avaliação econômica deve ser realizada sob diferentes pontos de vista. A perspectiva do paciente enfatiza principalmente os custos financeiros próprios e de sua família, assim como qualidade de vida e a falta ao trabalho; sendo que os gastos da previdência, do seguro social, do plano de saúde, de hospitalizações, do empregador ou da sociedade em geral são pouco importantes para ele.

A perspectiva da sociedade avalia os efeitos sociais e econômicos dos novos tratamentos, inclusive o cirúrgico; porém deveria examinar também os custos dos tratamentos em longo prazo e os custos e consequências do tratamento cirúrgico.

A perspectiva é um fator fundamental para definir as questões a serem pesquisadas e na avaliação dos custos e consequências de qualquer programa para as epilepsias dever-se-ia examinar também os custos e os benefícios sob a perspectiva da sociedade.

CO-MORBIDADES E CUSTO DO TRATAMENTO DOS PACIENTES COM EPILEPSIA

As co-morbidades acarretam sobrecarga financeira para os pacientes e seus familiares, podem afetar a qualidade de vida e aumentar os custos do tratamento (Vickrey, 1995; Devinsky e col., 1995; Cramer e VanHamme, 2003; Lee e col., 2005; Hermann e Jacoby, 2009). As co-morbidades aumentam os custos médicos por aumento do número e tipos de medicamentos, visitas para atendimento médico ambulatorial e hospitalizações (Boro e Haut, 2003).

As doenças afetivas e o status psiquiátrico, especialmente a depressão e a ansiedade, geralmente estão relacionadas à baixa qualidade de vida (Lehrner e col., 1999; Cramer, 2002). Entre todas as co-morbidades, a depressão aparece como o fator com maior custo econômico: o tratamento dos pacientes com epilepsia e com depressão mostrou ser 83,1% mais caro do que o tratamento dos pacientes com epilepsia sem depressão. Os altos custos com a depressão como co-morbidade justificam a necessidade de melhores métodos para o seu diagnóstico e tratamento.

CUSTOS NAS EPILEPSIAS RECÉM DIAGNOSTICADAS E NAS EPILEPSIAS REFRATÁRIAS

O custo da epilepsia pode variar dependendo da época de avaliação durante o curso da doença. O custo é mais alto, embora não necessariamente homogêneo, no momento do diagnóstico, e tende a diminuir posteriormente. Após o diagnóstico, o custo pode variar de acordo com a resposta terapêutica aos medicamentos antiepilépticos ou de acordo com a indicação de tratamento cirúrgico (Begley e cols, 1994). Para os pacientes refratários aos tratamentos com as DAEs convencionais, podem ser utilizadas as novas drogas, o que pode significar um aumento importante nos custos diretos (Reinharz e col., 1995; Heaney e col., 1998).

Na avaliação dos custos das DAEs, deve-se examinar a escolha do tratamento para os pacientes com epilepsia recém-diagnosticada e para os pacientes com epilepsia

refratária. É necessário também considerar as diferentes classes de drogas e, em alguns casos, os tratamentos que sejam mais ou menos agressivos. A escolha do medicamento é muito importante: os pacientes que respondem bem a um determinado medicamento deverão continuar com a mesma droga por muitos anos, pois as modificações podem levar a uma deterioração no controle das crises ou ao aparecimento de efeitos adversos. Portanto, a escolha de medicamentos caros como primeira opção pode ter importante impacto econômico nos tratamentos (Heaney e Begley, 2002).

COMENTÁRIOS FINAIS

Crianças e adultos têm diferentes necessidades no que se refere aos cuidados e atendimentos médicos e, conseqüentemente, com diferentes custos econômicos. Devido à frequência e duração das hospitalizações, o uso de novas DAEs e a necessidade de suporte psicoeducacional e de reabilitação, geralmente o custo econômico nas crianças é mais alto que nos adultos com epilepsia. Uma maior participação dos pediatras e clínicos gerais no tratamento efetivo das crianças com epilepsia, a avaliação farmacoeconômica mais eficiente, o uso de novas DAEs quando indicadas, o conhecimento das necessidades sociais e educacionais das crianças com epilepsia poderão ajudá-las a se tornar adultos bem integrados, profissionalmente estáveis, levando a uma diminuição dos custos sociais e pessoais a longo prazo.

Os fatores econômicos são muito importantes em todos os níveis de atendimento e tratamento para os pacientes com epilepsia, e o modo como os custos afetam as decisões médicas depende, em grande parte, dos países e dos sistemas de saúde considerados. Há muito trabalho a ser feito no desenvolvimento de instrumentos genéricos e específicos para avaliar adequadamente os custos econômicos das epilepsias em seus diferentes tipos, durações e evoluções. O desenvolvimento e a aplicação de medidas prognósticas são particularmente importantes, pois não basta avaliar o controle de crises: é necessário estimar a efetividade do tratamento no que tange à qualidade de vida do paciente. Isso permite comparar o custo/benefício/efetividade dos tratamentos para epilepsia com o de outras doenças neurológicas e não neurológicas.

São necessários estudos para verificar a percepção dos profissionais de saúde quanto ao custo das DAEs e dos tratamentos, de modo a evitar gastos com a adoção de tratamentos caros ou não adequados. Também deverá ser avaliado o entendimento dos significados de custo/benefício/efetividade e qualidade de vida. É preciso investigar, nas diferentes regiões geográficas, as decisões entre os diferentes tratamentos, entre médicos em atendimento primário de saúde e entre especialistas e epileptologistas. Também deverão ser avaliadas a influência e a interferência dos pacientes e familiares na escolha dos diferentes tratamentos.

Todos esses fatores poderão contribuir para o bom entendimento do papel dos aspectos econômicos e para a tomada de decisão nos tratamentos das pessoas com epilepsia, com melhores abordagens e escolhas mais adequadas, com melhor custo/benefício/efetividade e qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

1. Argumosa A, Herranz JI. Childhood epilepsy: a critical review of cost-of-illness studies. *Epileptic Dis* 2004; 6:31-40.
2. Beghi E, Atzeni L, Garattini L: Economic analysis of newer antiepileptic drugs. *CNS Drugs* 2008; 22(10):861-75.
3. Begley CE, Beghi E: The economic cost of epilepsy: a review of the literature. *Epilepsia* 2002; 43(s4):3-9.
4. Begley CE, Annegers JF, Lairson Dr, e col.: Cost of epilepsy in United States: a model based on incidence and prognosis. *Epilepsia* 1994; 35:1230-43.
5. Beran RG, Pachlatko C: Final report of the ILAE commission on economic aspects of epilepsy, 1994-1997. *Epilepsia* 1997; 38:1359-62.
6. Boro A e Haut S: Medical comorbidities in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Beh* 2003; 4:S2-S12.
7. Carpio A e Hauser WA: Epilepsy in the developing world. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2009; 9(4):319-26.
8. Chisholm D: Cost-effectiveness of first-line antiepileptic drug treatments in the developing world: a population-level analysis. *Epilepsia* 2005; 46(5):751-9.
9. Cockerell OC, Hart YM, Sander JW, Shorvon SD: The cost of epilepsy in the United Kingdom: an estimation based on the results of the two population-based studies. *Epilepsy Res* 1994(a);18:249-60.
10. Cockerell OC, Johnson AL, Sander JW, et al: Mortality from epilepsy: results from a prospective population-based study. *Lancet* 1994(b); 344:918-21.
11. Cramer J: Mood disorders are linked to health-related quality of life in epilepsy. *Epilepsy Beh* 2002; 3:491-2.
12. Cramer J e VanHamm G: Maintenance of improvement of health-related quality of life during long-term treatment with levetiracetam. *Epilepsy Behav* 2003; 4:118-23.
13. Davis KL, Candrilli SD, Edin HM: Prevalence and cost of nonadherence with antiepileptic drugs in adult managed care population. *Epilepsia* 2008; 49(3):446-54.
14. Devinsky O, Vickrey BG, Cramer J, e col.: Development of the quality of life in epilepsy inventory. *Epilepsia* 1995; 36:1089-94.
15. Fisher RS, Vickrey BG, Gibson P, e col.: The impact of epilepsy from the patient's perspective II: views about therapy and health care. *Epilepsy Res* 2000; 41:53-61.
16. Gordon K, MacSween J, Dooley J, e col.: Families are content to discontinue antiepileptic drugs at different risks than their physicians. *Epilepsia* 1996; 37:557-62.

17. Heaney DC, Shorvon SD, Sander JW: An economical appraisal of carbamazepine, lamotrigine, phenytoin and valproate as initial treatment in adults with newly diagnosed epilepsy. *Epilepsia* 1998; 39(suppl 3):S19-S25.
18. Heaney DC, Beran RG, Halpern MT: Economics in epilepsy treatment choices: our certain fate? *Epilepsia* 2002; 43(s4):32-8.
19. Heaney DC, Begley C: Economic evaluation of epilepsy treatment: a review of the literature. *Epilepsia* 2002; 43(suppl4):10-7.
20. Hermann B e Jacoby A: The psychosocial impact of epilepsy in adults. *Epilepsy Behav* 2009; 15 suppl 1):S11-S16.
21. Hong Z Qu B, Wu XT, Yang TH, e col.: Economic burden of epilepsy in developing country: a retrospective cost analysis in China. *Epilepsia* 2009; 50(10):2192-8.
22. Hughes D e Cockerell OC: A cost minimization study comparing vigabatrin, lamotrigine and gabapentin of the treatment of intractable partial epilepsy. *Seizure* 1996; 5:89-95.
23. Jacoby A, Buck D, Baker G, e col.: Uptake and costs of care for epilepsy: findings from a U.K. regional study. *Epilepsia* 1998; 39(7):776-86.
24. Langfitt JT: Cost evaluations in epilepsy: an update. *Epilepsia* 2000; 41(suppl 2):S62-S68.
25. Lee WC, Arcona S, Thomas SK, e col.: Effect of comorbidities on medical care use and cost among refractory patients with partial seizure disorder. *Epilepsy Behav* 2005; 7:123-6.
26. Lehrner UJ, Kalchmayr R, Serles W, e col.: Health-related quality of life (HRQOL), activity of daily living (ADL) and depressive mood disorder in temporal lobe epilepsy patients. *Seizure* 1999;8(2):88-92.
27. Markowitz MA, Mausekopf JA, Halpern MT: Cost-effectiveness model of adjunctive lamotrigine for the treatment of epilepsy. *Neurology* 1998; 51:1026-33.
28. Meyer AC, Dua T, Ma J, e col.: Global disparities in the epilepsy treatment gap: a systematic review. *Bull World Health Organ* 2010; 88(4):260-6.
29. Murray MI, Halpern MT, Leppik IE. Cost of refractory epilepsy in adults in USA. *Epilepsy Res* 1996; 8:456-48.
30. Platt M, Sperling MR: A comparison of surgical and medical costs for refractory epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43(s4):25-31.
31. Radhakrishnan K: Challenges in the management of epilepsy in resource-poor countries. *Nat Rev Neurol* 2009; 5(6):323-30.
32. Radhakrishnan K: Challenges in the management of epilepsy in resource-poor countries. *Nat Rev Neurol* 2009; 5(6):323-30.
33. Rao MB, RadhaKrishan K: Is epilepsy surgery possible in countries with limited resources? *Epilepsia* 2000; 41(s4):S31-S34.
34. Reinharz D, Kennedy W, Contrandiopoulos Ap, e col.: The economic effects of introducing vigabatrin, a new antiepileptic medication. *Pharmacoeconomics* 1995; 8:400-9.
35. Scorza FA, Arida RM, Terra VC, Cavalheiro EA: What can be done to reduce the risk of SUDEP? *Epilepsy Behav* 2010 Jul; 18(3):137-8.
36. Scorza FA, Albuquerque M, Arida RM, Terra VM, Cavalheiro EA: Sudden cardiac death in the young: could epilepsy be involved? *Clinics (São Paulo)*. 2010 Jul; 65(7):655-6.
37. Strzelczyk A, Reese JP, Dodel R, Hamer HM: Cost of epilepsy: a systematic review. *Pharmacoeconomics* 2008; 26(6):463-76.
38. Thomas SV: Money matters in epilepsy. *Neurol India* 2000; 48:322-9.
39. Tran DS, Ngoungou EB, Quet F, Preux PM: Management of epilepsy in developing countries. *Med Trop* 2007; 67(6):635-43.
40. Van Hout B, Gagnon D, Souêtre E e col.: Relationship between seizure frequency and costs and quality of life of outpatients with partial epilepsy in France, Germany, and the United Kingdom. *Epilepsia* 1997; 38(11):1221-6.
41. Vickrey BG: Special issue: advances in the measurement of health-related quality of life in epilepsy. *Qual Life Res* 1995; 4:83-5.
42. Yoon D, Frick KD, Carr DA, Austin JK: Economic impact of epilepsy in the United States. *Epilepsia* 2009; 50(10):2186-91.