The background of the cover is a microscopic image of neurons. The cell bodies are stained with a bright green fluorescent marker, while the nuclei are stained with a blue fluorescent marker. The neurons are densely packed and their processes are visible against a dark background.

**Encuentros**  
**en**  
**Neurociencias**  
**Vol. II**

Fernando Gámiz Ruiz  
Milagros Gallo Torre  
Francisco Vives Montero  
Editores



# ENCUENTROS EN NEUROCIENCIAS VOL. II

Gámiz F. Gallo M. & Vives F. (eds)




Instituto  
**Neurociencias**  
**Federico Olóriz**

© De cada capítulo su autores. 2013.




**Usted es libre de:**


 copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

 hacer obras derivadas.



**Bajo las condiciones siguientes:**

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

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

Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.

Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.

Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.

**Portada:** Tinción de inmunofluorescencia en células del giro dentado (hipocampo) usando anticuerpo acetil- histona H4 (verde) y Dapi para la tinción de los núcleos celulares (azul). Beatriz Gómez-Chacón

**Editorial Ciber S.C.**

**ISBN: 978-84-96876-87-7**

# PARTICIPANTES

## AUTORES

---

### CAPITULO 1

José Antonio Sáez-Moreno  
Raquel Piñar Morales  
José Manuel Rodríguez-Ferrer

### CAPITULO 2

José Manuel Rodríguez-Ferrer  
José Antonio Sáez-Moreno

### CAPITULO 3

Jorge L. Ordóñez Carrasco  
Juan Miguel García Leiva  
Elena Pita Calandre

### CAPITULO 4

Sara Bandrés  
Raquel Durán Ogalla  
Francisco Vives Montero

### CAPITULO 5

Pilar Sánchez  
Jesús M. Torres  
Beatriz Castro  
Esperanza Ortega

### CAPITULO 6

Laura Cabeza  
Gloria Perazzoli  
Jaime Antonio Oliver  
Cristina Jiménez  
Inmaculada Zafra  
Raúl Ortiz  
Jose Carlos Prados  
Consolación Melguizo  
Jose Luis Arias

Adolfina Ruiz  
Antonia Aránega

#### CAPITULO 7

Beatriz Gómez-Chacón  
Milagros Gallo

#### CAPITULO 8

Enrique Morillas  
Fernando Gámiz  
Milagros Gallo

#### CAPITULO 9

Ana Ching López  
Blanca Gutiérrez

#### CAPITULO 10

Esther Molina  
Blanca Gutiérrez  
Jorge A. Cervilla

## EDITORES

---

***Fernando Gámiz Ruiz***  
***Milagros Gallo Torre***  
***Francisco Vives Montero***

# ÍNDICE



---

PARTICIPANTES.....	3
ÍNDICE.....	5
PRÓLOGO.....	9
<b>CAPITULO 1.</b> Estudio de pacientes con neuropatía óptica mediante electroretinografía multifocal. <i>J. A. Sáez-Moreno, R. Piñar Morales y J. M. Rodríguez-Ferrer.....</i>	13
<b>CAPITULO 2.</b> Estudio de pacientes con retinosis pigmentaria mediante mfERG. <i>J. M. Rodríguez-Ferrer y J. A. Sáez-Moreno.....</i>	27
<b>CAPITULO 3.</b> Sintomatología gastrointestinal en la fibromialgia: frecuencia de presentación y posibles mecanismos patogénicos. <i>J. L. Ordóñez Carrasco, J. M. García Leiva y E. Pita Calandre.....</i>	39
<b>CAPITULO 4.</b> Biomarcadores en la enfermedad de Parkinson. <i>S. Bandrés, R. Durán y F. Vives.....</i>	55
<b>CAPITULO 5.</b> Efectos del estrés físico y medioambiental sobre los niveles de mRNA y proteínas de los isoenzimas de la 5alfa-reductasa tipo 1 y tipo 2 en corteza prefrontal de rata. <i>P. Sánchez, J. M. Torres, B. Castro y E. Ortega.....</i>	81
<b>CAPITULO 6.</b> Nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer de mama mediante nanoplataformas asociadas a Doxorubicina. <i>L. Cabeza, G. Perazzoli, J.A. Oliver, C. Jiménez, I. Zafra, R. Ortiz, J. Prados, C. Melguizo, J.L. Arias, A. Ruiz y A. Aránega.....</i>	101
<b>CAPITULO 7.</b> Memoria de reconocimiento visual y gustativa: comparación entre procesos y mecanismos. <i>B. Gómez-Chacon y M. Gallo.....</i>	121
<b>CAPITULO 8.</b> Neuroanatomía funcional de la memoria de reconocimiento visual y gustativas. <i>E. Morillas, F. Gámiz y M. Gallo.....</i>	149



**CAPITULO 9.** Avances en genética psiquiátrica: luces y sombras de una disciplina compleja

*A. Ching-López y B. Gutiérrez*.....181

**CAPITULO 10.** Interacción genético ambiental en depresión.

*E. Molina, B. Gutiérrez y J. A. Cervilla*.....211

# PRÓLOGO

## Nuevos tiempos

Sale a la luz el segundo volumen de “Encuentros en Neurociencias”. Celebrar unas jornadas y editar un libro es una buena meta. Lo difícil es conseguir que las jornadas del Instituto se celebren regularmente y editar un segundo volumen con nuevos resultados. Este esfuerzo necesita algo más, requiere un motor que mantenga a los investigadores avanzando. Y esa fuerza de empuje se llama ilusión. En estos tiempos es un bien escaso, pero ahora más que nunca necesitamos ilusión para conseguir esa beca o ese proyecto que nos permita seguir trabajando, ilusión para trabajar muchas veces a contracorriente, ilusión por acabar la tesis a la que le hemos dedicado cuatro años de nuestra vida. La ilusión por solucionar nuestros propios desafíos es lo que mantiene vivo al espíritu investigador.

Durante los años de bonanza hemos vivido dentro de una gran burbuja -no solo inmobiliaria- y hemos sido testigos de un crecimiento que parecía que nunca se iba a acabar. De pronto la burbuja ha estallado y hemos chocado con la realidad, con unas puertas que se han cerrado de golpe, con una financiación que se ha cortado en seco tanto para proyectos como para contratos de investigadores.

Yo no diría que vienen malos tiempos, más bien nos llegan nuevos tiempos. Nos vamos a encontrar con reglas de juego a las que no estamos acostumbrados, ha llegado la hora de adaptarse o morir. Tenemos que olvidarnos del pensamiento ancestral de la cultura agrícola de nacer, vivir y morir en mismo lugar. Tenemos que volver a ser cazadores y buscar el trabajo allí donde esté. Pero quiero dejar claro que mi mensaje es optimista. Tenemos científicos mejor preparados que antes, mejores laboratorios y mejores sistemas de información científica. Somos nosotros los que tenemos que cambiar de mentalidad, no esperar tanto de la política autonómica y central. Por muy buena voluntad que tengan los gobiernos, en nuestro país la financiación tardará años en recuperarse. El secreto va a estar en buscar las subvenciones en organismos internacionales o empresas privadas. Va a ser difícil, sí, pero nos tenemos que acostumbrar a competir frente a candidatos de otros países. Somos como ellos, ni mejores ni peores, y las barreras han sido muchas veces por razones de idioma más que por formación científica. Los investigadores, sobre todo los más jóvenes, no tenemos que capitular sino que tenemos que mantener el motor de la ilusión funcionando al máximo. En estos nuevos tiempos, nuestra voluntad,

trabajo, esfuerzo e ilusión serán las únicas llaves que nos permitirán abrir las puertas del campo de la investigación.

Estos diez capítulos son una muestra de las líneas de investigación que se llevan a cabo en los laboratorios de nuestro Instituto. Líneas actuales, que aunque lideradas por investigadores seniors, avanzan gracias al empuje de los miembros más jóvenes, los becarios y contratados que son los auténticos pilares que soportan la investigación y a los que deben dirigirse todas las ayudas.

Suerte a todos los que habéis presentado vuestros trabajos en la III Jornadas del Instituto de Neurociencias “Federico Olóriz”. Y no olvidéis que la suerte hay que buscarla, y que la ilusión es la luz que ayuda a encontrarla.

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





## Capítulo 1

# Estudio de pacientes con neuropatía óptica mediante electroretinografía multifocal

**J. A. Sáez-Moreno**  
**R. Piñar Morales**  
**J. M. Rodríguez-Ferrer**



# Estudio de pacientes con neuropatía óptica mediante electroretinografía multifocal

José Antonio Sáez-Moreno 1, 3, Raquel Piñar Morales<sup>1,4</sup> y José Manuel Rodríguez-Ferrer 1, 2

1, Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva, Instituto de Neurociencias, Universidad de Granada

2, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

3, Servicio de Neurofisiología Clínica, Hospital Universitario San Cecilio, Granada

4, Servicio de Neurología, Hospital Universitario San Cecilio, Granada

Direcciones de correo electrónico: JASM: ja.saez@hotmail.com RPM: raquelilla02@hotmail.com JMRF: jmferrer@ugr.es

*La neuropatía óptica es una alteración neurológica del nervio óptico, de etiología muy variada, que causa déficits visuales, especialmente disminución de la agudeza visual y de la visión cromática. Entre las técnicas disponibles para la valoración de la vía visual está el electroretinograma multifocal (mfERG), técnica desarrollada recientemente que permite registrar la actividad eléctrica focal de la retina externa. El objetivo del estudio ha sido determinar la posible alteración de la retina externa en pacientes con neuropatía óptica. En 11 pacientes con neuropatía óptica axonal o desmielinizante, se han realizado registros electrofisiológicos en 61 áreas de la retina mediante mfERG. Se analizaron las latencias de las ondas N1 y P1 de cada registro, así como la densidad eléctrica de las áreas estudiadas. En todos los pacientes estudiados se han encontrado alteraciones cualitativas y/o cuantitativas en los registros obtenidos. Las alteraciones cualitativas consisten en la presencia de ondas polifásicas en diversas áreas de la retina y que variaron según los pacientes. Las alteraciones cuantitativas consisten en un descenso de la densidad eléctrica de la mayoría de las áreas estudiadas, especialmente en la región central de la retina. Los resultados muestran que, en pacientes con neuropatía óptica, existe una alteración en la actividad electrofisiológica de los componentes más externos de la retina, fotorreceptores y células bipolares. En futuras investigaciones, sería importante determinar el mecanismo por el que se produce este hecho e identificar las consecuencias funcionales y clínicas de dichas alteraciones.*

---

## **Introducción**

La neuropatía óptica hace referencia a un proceso patológico en la estructura o función del nervio óptico. En la mayoría de los casos, se manifiesta con una disminución de la agudeza visual, alteración en la visión de los colores, déficit campimétrico y en ocasiones puede acompañarse de edema papilar o atrofia [17]. La causa específica de la neuropatía se establece en la mayoría de las ocasiones en base a la historia clínica, la exploración visual y los hallazgos



en fondo de ojo, aunque en la práctica clínica habitualmente suele apoyarse en pruebas complementarias tanto de imagen como neurofisiológicas.

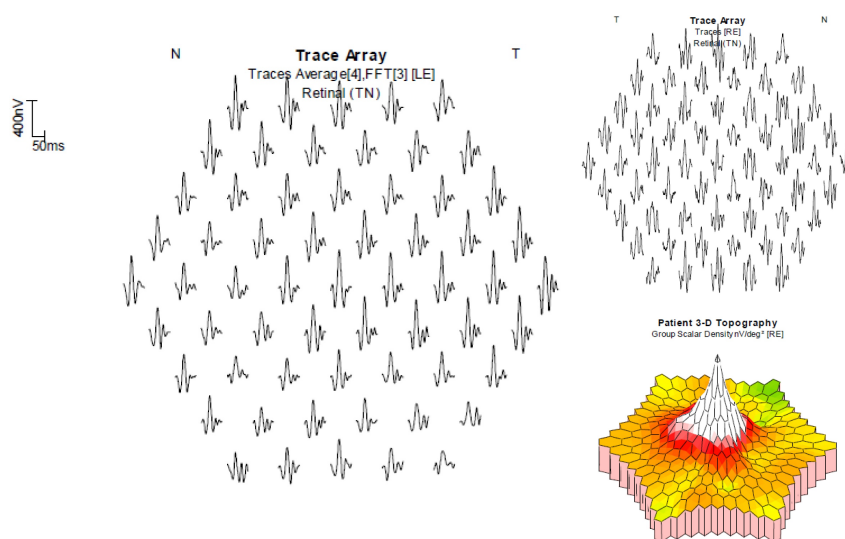
En la valoración de una neuropatía óptica adquirida hay que tener en cuenta tanto los antecedentes del paciente, los síntomas visuales y los síntomas neurológicos asociados si existen, la exploración visual y los hallazgos en fondo de ojo. Así, podemos encontrar neuropatías ópticas con fondo de ojo normal, atrófico o edematoso; neuropatías unilaterales o bilaterales y, en función de la presentación clínica, neuropatías agudas o crónicas.

En las neuropatías ópticas, se distinguen la neuritis retrobulbar inflamatoria y la neuropatía óptica isquémica. La neuritis óptica retrobulbar es un proceso inflamatorio del nervio óptico que puede estar causada por diferentes enfermedades autoinmunes sistémicas, infecciosas, ser de origen isquémico, estar asociada a esclerosis múltiple o no encontrarse causa alguna. Se caracteriza por disminución de la agudeza visual o alteración en la visión de los colores de inicio subagudo y progresión durante una semana aproximadamente, asociado en el 90% de los casos a dolor retroocular que se exacerba con los movimientos oculares [1]. La afectación es unilateral en la mayoría de los casos y en las semanas posteriores se produce una recuperación del déficit, que puede ser parcial o completa. La neuropatía óptica isquémica es la causa más común en pacientes mayores de 50 años. Puede afectar a la parte anterior del disco óptico (neuropatía óptica isquémica anterior) o ser retrobulbar, con un aspecto normal del disco óptico. El origen de la neuropatía isquémica puede ser artrítica, cuando la afectación del nervio óptico está en relación con una arteritis de células gigantes, o no artrítica cuando se produce de forma idiopática por oclusión de una de las arterias que irrigan el nervio óptico [10].

En la práctica clínica disponemos de distintos métodos para valorar alteraciones visuales producidas por la neuropatía óptica. Así, se utiliza como técnica de imagen la tomografía de coherencia óptica. Con ella se obtiene una imagen en dos dimensiones de las microestructuras de la retina [6]. En el caso de neuropatías ópticas se ha utilizado especialmente para la medición del grosor de la capa axonal de fibras [7, 21]. Por otro lado, se utilizan técnicas

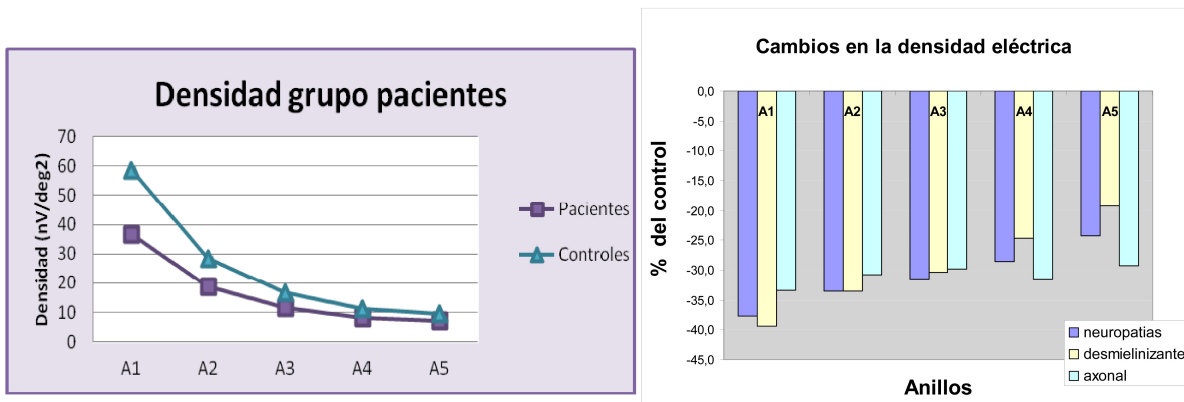
neurofisiológicas que analizan la actividad eléctrica de los diversos componentes de la vía visual [11]. Así, el electroretinograma Ganzfeld mide la actividad de los fotorreceptores y de las células bipolares. El electroretinograma patrón aporta información de la capa interna de la retina, en especial sobre las células ganglionares, en su región central mediante la presentación de estímulos visuales estructurados, habitualmente dameros con diferente tamaño de cuadros. Los potenciales evocados visuales registran la actividad de la corteza visual en respuesta a dameros o barras de diferente tamaño o frecuencia espacial. Esta última técnica, en la que se mide además el tiempo en que aparece la respuesta cortical al estímulo, ha mostrado su utilidad en la valoración de la vía visual y en la caracterización de las lesiones según se traten de alteraciones predominantemente en la mielina o bien en los axones [9]. Más recientemente se ha incorporado una nueva técnica electrofisiológica denominada electroretinografía multifocal (mfERG). La mfERG, desarrollada por Sutter y Tran, permite un estudio focal de la retina y no de manera global como lo hace el electroretinograma Ganzfeld. La mfERG consiste en la estimulación local

simultánea de diferentes áreas de la retina permitiendo la obtención de un mapa topográfico de la actividad eléctrica de dichas zonas [9]. Se utiliza como estímulo un patrón de 61, 103 o 241 hexágonos, de mayor superficie cuanto más periféricos, que alter-



**Figura 1. mfERG. A la izquierda se muestra un registro mfERG normal. A la derecha se muestra el registro, y su reconstrucción tridimensional, de un paciente con neuropatía óptica. En este caso se puede observar como las ondas de la mayoría de los hexágonos muestran una morfología polifásica. No obstante, la densidad de las respuestas de este paciente es similar a la de los sujetos normales.**

nan de blanco a negro de forma pseudorandomizada. De cada región retiniana estudiada se obtiene una onda con una primera deflexión negativa (denominada N1) que representa de manera predominante la respuesta de los fotorreceptores, seguida de una onda positiva (denominada P1) que representa la actividad de las células bipolares. En sujetos normales la amplitud de las ondas varía según el área de la retina, siendo mayor en la fóvea y menor conforme aumenta la excentricidad [19, 20].



**Figura 2. Efectos de la neuropatía óptica en la mfERG. A la izquierda se muestra la densidad media de los anillos A1-A5 en sujetos control normales y en los pacientes de neuropatía óptica. A la derecha se muestra el porcentaje de disminución de la densidad obtenida en los once pacientes en conjunto y subdivididos en los grupos de neuropatía desmielinizante y axonal.**

La mfERG se ha mostrado como una técnica muy útil en el estudio distintas patologías retinianas, especialmente las distrofias de la retina [4, 18, 20]. Sin embargo, el uso de la mfERG ha sido muy puntual en la valoración de entidades clínicas que afectan primariamente al nervio óptico. En las neuropatías ópticas es conocido que se pueden afectar de forma retrógrada las células ganglionares, pero se desconoce si también afecta a capa externa de retina o si la alteración en el nervio óptico influye de alguna manera en la función de las células de la retina en su capa más externa. El objetivo del presente estudio ha sido investigar mediante mfERG el estado de la retina externa en pacientes con neuropatía óptica.

## **Métodos**

**Pacientes.** Se han analizado 11 pacientes, con una edad comprendida entre los 22 y los 73 años, diagnosticados de neuropatía óptica por el servicio de Neurología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

**mfERG.** La evaluación de la retina mediante mfERG se realizó, en el Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva, del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Granada, con el equipo Diagnosys (Diagnosys LLC, Lowell MA, USA). Los registros con mfERG se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Electrofisiología Clínica de la Visión (ISCEV) [13]. Los pacientes se sentaron a 33 cm de la pantalla de estimulación. El estímulo utilizado fue una matriz de 61 hexágonos que subtiende 60° en la retina. Los filtros utilizados fueron de 10 Hz y 100 Hz. Los estímulos se proyectaron en un monitor LCD, con una secuencia m de 14 bits a 75 Hz. La cadencia de los estímulos está diseñada de manera que cada hexágono tiene aproximadamente un 50% de probabilidades de ser blanco o negro en cada pantalla. La luminancia de los hexágonos blancos fue de 800 cd/m<sup>2</sup>, la de los negros 0 cd/m<sup>2</sup> y la del fondo fue de 400 cd/m<sup>2</sup>. Las señales eléctricas se obtuvieron mediante electrodos corneales de fibra DTL (Diagnosys LLC, Lowell MA, USA) y se amplificaron con una frecuencia de muestreo de 1.200Hz. La respuesta correspondiente a cada región de la retina se obtuvo mediante un análisis kernel de orden 1 de la relación existente entre la fluctuación del campo eléctrico y los cambios de luminancia de cada hexágono. Como se ha comentado anteriormente la respuesta consiste en una onda bifásica N1-P1. Se realizó también un análisis agrupando las 61 respuestas en 5 anillos concéntricos. La onda que se obtiene en cada anillo es un promedio de las ondas que lo integran, salvo para el primer anillo (A1), que corresponde a la respuesta del hexágono central. Se midió la latencia (ms) de las ondas N1 y P1

para cada respuesta individual, así como la densidad eléctrica (nV/grado<sup>2</sup>) de cada anillo. De los 11 pacientes, todos presentaban disminución de la agudeza visual uni o bilateralmente excepto uno de los pacientes, cuyo síntoma principal era la alteración en la visión cromática. A la hora del análisis se han tenido en cuenta únicamente los ojos patológicos, encontrando en total 15 ojos con neuropatía óptica. Seis de los pacientes tenían una neuropatía óptica desmielinizante y cinco una neuropatía óptica axonal.

Los datos obtenidos con mfERG se analizaron tanto cuantitativa como cualitativamente. Desde el punto de vista cuantitativo se ha valorado principalmente la densidad eléctrica medida en nV/deg<sup>2</sup> en cada una de las circunferencias o “anillos” y la latencia de N1 y P1, teniendo como referencia los valores medios de un grupo control del Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva de la Facultad de Medicina. Para el análisis estadístico se ha utilizado la T de Student. En el análisis cualitativo, se atendió a la morfología bifásica o polifásica de las ondas obtenidas en los 61 hexágonos.

## **Resultados**

Todos los pacientes estudiados presentaron anomalías en la mfERG. En dos de ellos, ambos con una neuropatía óptica bilateral (una axonal y otra desmielinizante), los valores de latencia de P1 y N1 y los de densidad eléctrica eran similares a los valores normales, sin embargo, el topograma obtenido con la mfERG se caracterizó por la presencia de ondas polifásicas mal definidas, en un número variable de áreas (Fig. 1). En el resto de los pacientes se observaron alteraciones en la morfología de los registros así como una disminución generalizada de la densidad de los registros.

Teniendo en cuenta todos los pacientes, y como se muestra en la parte izquierda de la figura 2, se encontró una disminución de la densidad eléctrica en todos los anillos, siendo esta mayor en anillo central (A1). Comparado con los valores normales, este descenso fue significativo los anillos A1 y A4 ( $p < 0.01$ ) y A2 y A3 ( $< 0.001$ )

En la parte derecha de la figura 2, se comparan los resultados de los pacientes agrupados en neuropatía óptica desmielinizante y en axonal. En las neuropatías ópticas desmielinizantes se encuentran descensos significativos ( $p < 0.01$ ) en las densidades de los anillos A1-A3. En este grupo, el descenso de la densidad se atenúa con la excentricidad de los anillos. Así, la reducción de la densidad del anillo central (A1) fue del 39% y la del más periférico (A5) del 19%. En el grupo de neuropatía axonal, el descenso fue más homogéneo en todos los anillos, con reducciones medias sobre el 30%. En este grupo, la disminución de la densidad fue significativa ( $p < 0.01$ ) en los anillos A2-A4. Las latencias de las ondas N1 y P1 fueron, de forma global, similares a las encontradas en los sujetos control. Aun cuando no se observó significación estadística, en el grupo de neuropatía axonal las latencias de las ondas N1 y P1 se encontraron ligeramente retrasadas.

## **Discusión**

A diferencia de las técnicas electrofisiológicas precedentes (15), la mfERG valora la actividad eléctrica focal de la retina externa, principalmente de los fotorreceptores y las células bipolares (12). Esto, permite detectar alteraciones retinianas no muy extensas y difíciles de evaluar con las técnicas neurofisiológicas que miden la actividad eléctrica global de la retina (16). En los trabajos publicados, de forma general se ha considerado que el registro de primer orden o Kernel 1, al valorar la función de células bipolares y fotorreceptores, no se afecta de forma significativa en las neuropatías ópticas (16). No obstante, se ha sugerido que la patología del nervio óptico puede influir en la morfología de las ondas en el topograma, sin alteración en los valores de latencia o de densidad eléctrica. No obstante, esta inferencia se basa principalmente en estudios experimentales con animales, principalmente en macacos tras la inyección intravítrea de tetradotoxina y en gatos tras sección del nervio óptico y con resultados no concordantes en algunos casos (2, 14).

También hay casos aislados en series de pacientes, pero no existe en la literatura una serie amplia de pacientes con neuropatía óptica y registro mfERG.

En nuestro estudio hemos valorado mediante mfERG pacientes con neuropatía óptica de distintas etiologías. Según lo establecido previamente, al tratarse de patologías que afectan fundamentalmente a las células ganglionares o a sus axones no tendríamos que encontrar alteraciones cuantitativas significativas en kernel 1 y sí que estaría dentro de lo previsible una alteración en la morfología de las ondas. Sin embargo, los hallazgos de este estudio han mostrado alteraciones cuantitativas en la mayoría de los pacientes, que afecta principalmente a la densidad eléctrica y más intensamente en el anillo 1. Estos resultados pueden explicarse desde el punto de vista fisiológico si tenemos en cuenta la retina como una unidad funcional. Es conocido que tras una lesión en las células de retina externa existe una remodelación funcional y estructural de la retina en su conjunto [3]. En patologías degenerativas que afectan a los fotorreceptores, como la retinosis pigmentaria, tras la muerte de los mismos ocurren una serie de cambios que afectan a todos los componentes de la retina. De esta forma, aparecen nuevas sinapsis, las células de la capa externa migran hacia capas más internas y viceversa, con el resultado final de una remodelación completa de la retina.

En diversas neuropatías se ha podido comprobar cómo tras una lesión en el nervio óptico se produce una muerte y degeneración de las células ganglionares [5, 24]. Por ejemplo, en el caso de la esclerosis múltiple (enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central), en el que existe con frecuencia una afectación del nervio óptico, se ha podido demostrar por tomografía de coherencia óptica una pérdida de células ganglionares y de sus axones [23]. En estudios postmortem, se ha comprobado que además de la pérdida de células ganglionares existe una atrofia de otras capas de la retina con pérdida de células bipolares y horizontales [8]. Se ha postulado que esta pérdida neuronal es consecuencia de una degeneración retrograda transneuronal. A pesar de que no parece existir una disminución asociada de

fotorreceptores, los cambios anteriormente descritos podrían inducir una remodelación funcional de la retina externa, modificando asimismo su actividad eléctrica. Desconocemos el motivo por el cual en nuestros resultados se observa un patrón diferente de alteración en la actividad eléctrica en retina externa según predomine el daño axonal o sea eminentemente desmielinizante. Como se puede apreciar en la figura 2, el descenso de la densidad eléctrica es más homogéneo en el subgrupo de neuropatía axonal. Dado que los resultados presentes provienen de una muestra pequeña y heterogénea, sería conveniente ampliar el estudio con un mayor número de casos para confirmar este aspecto.

## **Conclusiones**

En pacientes con neuropatía óptica existe una alteración en la función de los componentes más externos de la retina, que en la mfERG, se evidencia con respuestas de menor densidad y con la presencia de ondas polifásicas. Sería muy interesante investigar en futuros estudios si estas alteraciones se deben o no a una afectación retrógrada de la retina inducida por la enfermedad.



## **Referencias**

1. Balcer LJ. Optic Neuritis. *N Engl J Med* 2006; 354:1273-80.
2. Bearnse MA, Sutter EE. Imaging localized retinal dysfunction with the multifocal electroretinogram. *J Opt Soc Am A Opt* 1996; 13:634-640.
3. Bryan WJ, Marc RE. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2005; 81:123-137.
4. Chan HL, Brown B. Multifocal ERG changes in glaucoma. *Ophthalmic Physiol Opt* 1999; 19:306-316.
5. Chen CS, Johnson MA, Flower RA, Slater BJ, Miller NR, Bernstein SL. A primate model of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 9:2985-2992.
6. Costello F. Evaluating the Use of Optical Coherence Tomography in Optic Neuritis. *Mult Scler Int* 2011; 2011:1483-94.
7. Costello F, Coupland S, Hodge W. Quantifying axonal loss after optic neuritis with optical coherence tomography. *Ann Neurol* 2006; 59:963-9.
8. Green AJ, McQuaid S, Hauser SL, Allen AV, Lyness, R. Ocular pathology in multiple sclerosis: retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration. *Brain* 2010; 133: 1591-1601.
9. Halliday, A.M.; McDonald W.I.; Mushin, J. Visual evoked response in diagnosis of multiple sclerosis. *BMJ* 1973; 4:661-664.
10. Hayreh SS. Posterior ischaemic optic neuropathy: clinical features, pathogenesis and management. *Eye* 2004; 18:1188-1206.
11. Holder GD. Electrophysiological assessment of optic nerve disease. *Eye* 2004; 18: 1133-1143.
12. Hood DC, Odel JG, Chen CS, Winn BJ. The Multifocal Electroretinogram. *J Neuro-Ophthalmol* 2003; 23: 225-235.
13. Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons J.S. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG). (2011 edition) *Doc Ophthalmol* 2012; 124:1-13.
14. Hood DC, Frishman LJ, Viswanathan S, Robson JG, Ahmed J. Evidence for a ganglion cell contribution to the primate electroretinogram (ERG): effects of TTX on the multifocal ERG in macaque. *Vis Neurosci* 1999; 16:411-416.
15. Hood DC, Seiple W, Holopigian K, Greenstein V. A comparison of the components of the multifocal and full-field ERGs. *Vis Neurosci* 1997; 14:533-544.
16. Kretschmann U, Bock M, Gockeln R, Zrenner E. Clinical applications of multifocal electroretinography. *Oc Ophthalmol* 2000; 100:99-113.
17. Lee AG, Brazis PW. Clinical pathways in neuro-ophthalmology. An evidenced based approach. New York, NY Thieme Medical Publishers, 1998.
18. Miyake Y, Horiguchi M, Suzuki S, Tanikawa A. Clinical evaluation of

- multifocal electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:2146-2150.
19. Nagatomo A, Nao-i N, Maruiwa F, Arai M, Sawada. Multifocal electroretinograms in normal subjects. *Jpn J Ophthalmol* 1998; 42:129-35.
20. Palmowski AM, Sutter EE, Bearnse MA, Fung W. Mapping of Retinal Function in Diabetic Retinopathy Using the Multifocal Electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:2586-2596.
21. Saidha S, Syc SB, Ibrahim MA, Eckstein B, Warner CV, Farrell SK. Primary retinal pathology in multiple sclerosis as detected by optical coherence tomography. *Brain* 2011; 134: 518–533.
22. Sutter EE, Tran D. The field topography of ERG components in man--I. The photopic luminance response. *Vision Res* 1992; 32:433-36.
23. Syc SB, Saidha S, Newsome SD, Ratchford JD, Levy M, Ford ET. Optical coherence tomography segmentation reveals ganglion cell layer pathology after optic neuritis. *Brain* 2012; 135: 521-533.
24. Tátrai E, Simó M, Iljicsov E, Németh J, DeBuc DC, Somfai GB. In Vivo Evaluation of Retinal Neurodegeneration in Patients with Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* 2012; 7: e30922.



## Capítulo 2

# Estudio de pacientes con retinosis pigmentaria mediante mfERG

**J. M. Rodríguez-Ferrer**  
**J. A. Sáez-Moreno**



# Estudio de pacientes con retinosis pigmentaria mediante mfERG

José Manuel Rodríguez-Ferrer 1, 2 y José Antonio Sáez-Moreno 1, 3

1, Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva, Instituto de Neurociencias, Universidad de Granada

2, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

3, Servicio de Neurofisiología Clínica, Hospital Universitario San Cecilio, Granada

Direcciones de correo electrónico: JASM: ja.saez@hotmail.com JMRF: jmferrer@ugr.es

*La electrorretinografía multifocal (mfERG) es una nueva técnica electrofisiológica que permite obtener un mapa topográfico de la actividad eléctrica de la retina. El objetivo de este trabajo ha sido analizar la retina de pacientes con retinosis pigmentaria mediante esta técnica. Se utilizó como estímulo una matriz de 61 hexágonos, con cambios de luminancia, que subtiende 60° de ángulo visual. Todos los pacientes estudiados mostraron áreas retinianas con respuesta eléctrica disminuida y/o indetectable. El número y localización de las áreas alteradas varió entre los pacientes, reflejando la gravedad de la enfermedad, así como la existencia de importantes diferencias interindividuales. Estos resultados muestran la utilidad de la electrorretinografía multifocal para determinar la localización de las alteraciones degenerativas de la retina en los pacientes con retinosis pigmentaria y que no pueden ser evidenciadas por técnicas precedentes.*

---

## **Introducción**

El término de retinosis pigmentaria (RP) se utiliza para designar a un grupo de enfermedades degenerativas hereditarias de la retina que conlleva a una pérdida lenta y progresiva de la visión. En España, se estima en 15.000 el número de afectados y en 500.000 las personas portadoras de los genes defectuosos y que son potenciales transmisores de esta enfermedad [2]. En el mundo, la RP afecta a una entre 3.500 y 4.000 personas [13].

La RP se caracteriza por una pérdida inicial de los fotorreceptores y la alteración del epitelio pigmentario, seguida de una progresiva degeneración y atrofia de la retina en todas sus capas. Existen diferentes formas clínicas de RP. En la forma clínica más frecuente, denominada bastón-cono, los bastones son los fotorreceptores más afectados. En una fase temprana, se manifiesta con ceguera nocturna y reducción periférica del campo visual. A medida que avanza

la enfermedad se afectan los conos, produciéndose pérdida de la agudeza visual y alteración en la visión de colores [15]. En el tipo de retinosis denominado cono-bastón, existe una alteración simultánea de conos y bastones y muestra en un estadio temprano una mayor pérdida de la visión central. No obstante, los síntomas visuales son panretinianos y a menudo incluyen pérdida de la visión nocturna y del campo visual periférico [15]. El grado de afectación visual es variable para ambas formas, siendo posible la ceguera en la fase más avanzada. A parte de estas dos formas de RP, consideradas como típicas ya que las alteraciones están restringidas a la retina, existen formas complejas o sindrómicas en las que los pacientes tienen también alteraciones asociadas no oculares como son los síndromes de Usher, Bardet-Biedl, Refsum, Bassen-Kornzweig y Kearns-Sayre o las enfermedades de Batten, Alstrom y la mucopolisacaridosis [13, 15]. Las alteraciones genéticas en la RP son múltiples y el número de mutaciones descritas se incrementa continuamente [1, 15]. Hasta el momento, se han identificado 59 genes relacionados con la RP [1]. Estos genes codifican proteínas que intervienen en diversos aspectos de la fisiología visual como es la fototransducción, el ciclo visual y la transcripción y/o estructura de los fotorreceptores. La RP presenta diversos patrones de herencia y algunos genes parecen tener más de un modo de transmisión. Las estimaciones de los tipos de herencia de la RP varían según los diversos estudios y oscilan entre 20-41% para los casos de herencia autosómica recesiva, 15-20% los de autosómica dominante, 10-22% ligada al cromosoma X, mientras que el 12-55% restante sería para formas esporádicas, no asociadas a historia familiar, y catalogadas como simples [1, 3, 17]. La edad de comienzo, el grado de progresión y la presencia o ausencia de enfermedades oculares asociadas están frecuentemente relacionados con el modo de herencia. Además, la apariencia clínica puede variar incluso para una misma mutación entre los miembros de una familia o entre distintas familias [1].

La electroretinografía tipo Ganzfeld (ERG) es la técnica que habitualmente se utiliza para el diagnóstico y tipificación de la RP ya que analiza de forma objetiva el estado funcional de los fotorreceptores [10]. Mediante

electrodos corneales, se registra la respuesta eléctrica de los bastones a estímulos lumínicos proyectados en la retina tras un periodo de adaptación a la oscuridad y la de los conos a estímulos lumínicos de mayor intensidad, tras un periodo de adaptación a la luz.

En 1992, Sutter y Tran desarrollaron una técnica electrofisiológica que permite el estudio focal de la retina y no de manera global como lo hace la ERG. Esta nueva técnica denominada electrorretinografía multifocal (mfERG) consiste en la estimulación local simultánea de diferentes áreas de la retina permitiendo la obtención de un mapa topográfico de la actividad eléctrica de dichas zonas [18]. Se utiliza como estímulo un patrón de 61, 103 o 241 hexágonos, de mayor superficie cuanto más periféricos, que alternan de blanco a negro de forma pseudo-randomizada y que se presentan en una pantalla de luminancia constante. De cada área estimulada se obtiene un registro que consiste en una onda bifásica con un componente negativo inicial (N1) seguido de un pico positivo (P1). El componente N1 está producido por la despolarización de las células bipolares tipo ON, mientras que el pico P1 depende de la despolarización de las células bipolares tipo ON y OFF y de la recuperación de las células bipolares tipo ON, por este orden [9]. Al tratarse de una prueba topográfica, además de la amplitud y latencia de onda se obtiene la densidad de la respuesta retiniana de cada hexágono expresada en nanovoltios por grado al cuadrado (nV/deg<sup>2</sup>). Aun cuando las señales obtenidas mediante mfERG se denominan habitualmente como respuestas, conviene señalar que estas no son potenciales eléctricos obtenidos directamente de las áreas retinianas, sino que son inferencias matemáticas derivadas de una función de correlación cruzada entre la señal obtenida y el patrón que aparece en la pantalla. Es importante destacar que debido al alto nivel de luminancia y a la alta frecuencia de estimulación utilizada, la mfERG estudia principalmente la actividad de los conos. En resumen y a diferencia de técnicas precedentes, la mfERG permite un análisis topográfico detallado de la actividad eléctrica de la retina y la localización de las áreas alteradas [11, 12]. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la retina de pacientes con RP mediante la técnica de mfERG, disponible en nuestro



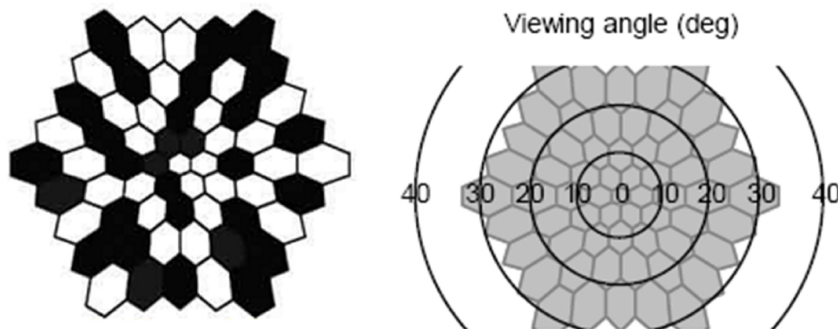
Laboratorio de Neurociencia Visual y Cognitiva, del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Granada. Localizar las zonas de la retina alteradas en los pacientes de RP es especialmente relevante ya que puede orientar la aplicación intraocular de los futuros tratamientos para esta enfermedad.

## **Métodos**

**Sujetos.** Se estudiaron 6 pacientes de RP (5 mujeres y 1 varón, de edades comprendidas entre 20 y 61 años). Ninguno de los pacientes presentaba otra patología visual asociada. Todos los sujetos dieron su conformidad para participar en este estudio.

**Material y procedimiento.** La mfERG se realizó con el equipo Diagnosys (Diagnosys LLC, Lowell MA, USA) y siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Electrofisiología Clínica de la Visión (ISCEV) [5]. Los

pacientes se sentaron a 33 cm de la pantalla de estimulación. El estímulo utilizado fue una matriz de 61 hexágonos que

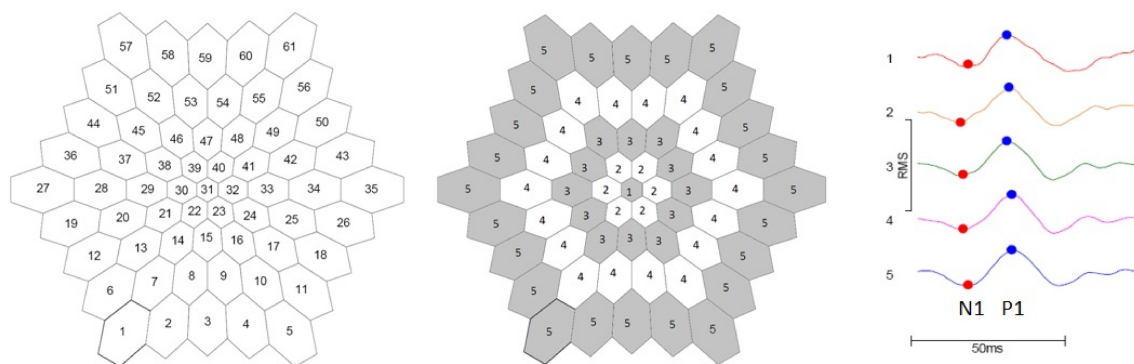


subtiende  $60^\circ$  en la retina (Fig.1). Los filtros utili-

Figura 1. Patrón de estimulación utilizado. A la izquierda se muestra el estímulo empleado consistente en 61 hexágonos y a la derecha el campo visual estimulado.

zados fueron de 10 Hz y 100 Hz. Los estímulos se proyectaron en un monitor LCD, con una secuencia m de 14 bits a 75 Hz. La cadencia de los estímulos está diseñada de manera que cada hexágono tiene aproximadamente un 50% de probabilidades de ser blanco o negro en cada pantalla. La luminancia de los hexágonos blancos fue de 800 cd/ m<sup>2</sup>, la de los negros 0 cd/m<sup>2</sup> y la del fondo

fue de 400 cd/m<sup>2</sup>. Las señales eléctricas se obtuvieron mediante electrodos corneales de fibra DTL (Diagnosys LLC, Lowell MA, USA) y se amplificaron con una frecuencia de muestreo de 1.200Hz. La respuesta correspondiente a cada región de la retina se obtuvo mediante un análisis kernel de orden 1 de la relación existente entre la fluctuación del campo eléctrico y los cambios de luminancia de cada hexágono. Como se ha comentado anteriormente, esta respuesta consiste en una onda bifásica con una deflexión negativa inicial denominada N1, seguida de un pico positivo denominado P1. Se midió la latencia (ms) y amplitud (nV) de la onda P1 para cada respuesta individual, así



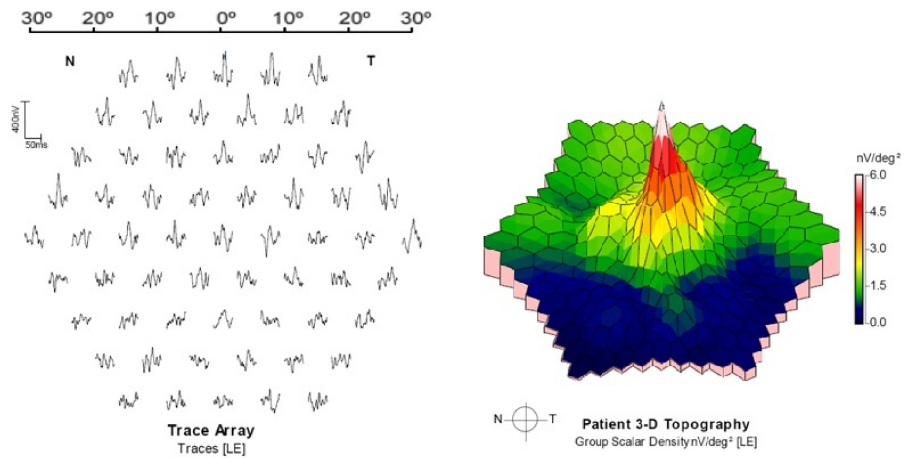
**Figura 2. Numeración de hexágonos.** A la izquierda se muestra la numeración que identifica a los 61 hexágonos. En el centro la agrupación en 5 anillos y a la izquierda las ondas N1 y P1 promedio de cada anillo.

como la densidad eléctrica (nV/grado<sup>2</sup>) de cada área estimulada. En los casos en que se obtuvieron respuestas para la mayoría de los hexágonos, también se realizó un análisis agrupando las 61 respuestas en 5 anillos concéntricos, tal y como se muestra en la figura 2, y numerados del 1 al 5. La onda que se obtiene en cada anillo es un promedio de las ondas que lo integran, salvo para el anillo 1, que corresponde a la respuesta del hexágono central (hexágono 31).

## **Resultados**

Tres de los pacientes (R1-3) mostraron señales detectables en todos los hexágonos presentados, aun cuando para algunos de los mismos la morfología

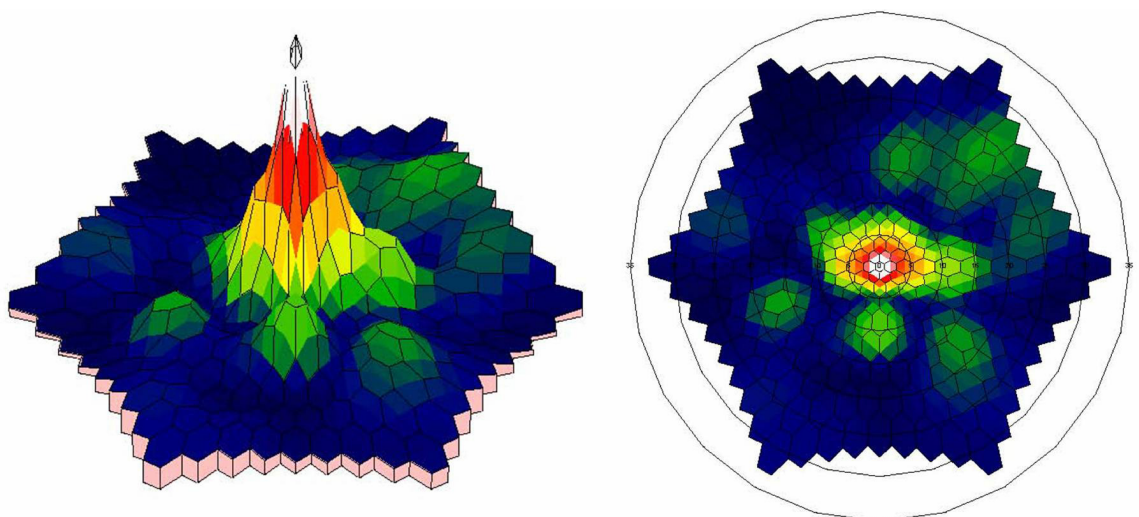
de la onda registrada fue polifásica. Así, en el paciente R3, como se muestra en la figura 3 y que se utiliza como ejemplo, se observaron



**Figura 3. mfERG.** A la izquierda se muestran las ondas correspondientes a cada hexágono y a la derecha la reconstrucción tridimensional del registro obtenido con mfERG en el paciente R3. Se puede apreciar la falta de actividad eléctrica en el tercio inferior de la retina.

ondas poli-fásicas en diversos hexágonos, especialmente en el tercio inferior de la retina. Esto se muestra como una zona de muy baja densidad en la porción inferior de la representación tridimensional (Fig. 3).

En estos tres pacientes, se pudo realizar un análisis por anillos. Los valores de densidad obtenidos en los anillos 1-5 en estos pacientes fueron 49.2, 16.6, 10.5, 7.3 y 6,9 nV/grado<sup>2</sup>, respectivamente para R1; 47.1, 21.5, 11,9, 6.8 y



**Figura 4. mfERG.** A la izquierda se muestra la reconstrucción tridimensional y a la derecha la bidimensional del registro obtenido con mfERG en el paciente R4. En esta figura se pueden apreciar zonas retinianas aisladas con actividad eléctrica mantenida.

5.5 nV/grado<sup>2</sup>, respectivamente para R2 y 20.6, 10.4, 4.9, 3.5 y 3.3 nV/grado<sup>2</sup>, respectivamente para R3.

En los 3 pacientes restantes (R4-6), se encontró una onda bifásica N1-P1 en el hexágono 31 (central) y en algunos hexágonos adyacentes. En estos casos, la mayor densidad se obtuvo también en el hexágono 31 y la reconstrucción tridimensional mostró un pico central rodeado de un área de muy baja densidad (Fig. 4). En el paciente R4, cuyos resultados se muestran en la figura 4, se encontraron ondas de morfología predominantemente bifásica en los hexágonos 15, 24, 31 y 40; en el paciente R5 en los hexágonos 30, 31 y 32 y en el paciente R6 en los hexágonos 22, 23, 31, 32 y 39.

## **Discusión**

A diferencia de las técnicas electrofisiológicas precedentes, la electrorretinografía multifocal permite obtener un mapa topográfico de la actividad eléctrica de la retina. En nuestro estudio, de cada sujeto se analizaron 61 áreas retinianas, bien individualmente o agrupadas en 5 anillos concéntricos. Así, en los pacientes RP1-3, que presentaron respuestas registrables en la mayoría de los hexágonos se pudo realizar un análisis por anillo. Lyons y Severns [8] han establecido unos límites de normalidad de los cocientes de densidad entre el anillo 1 y el resto de anillos, siendo estos 2.6, 4.5, 6.9 y 7.7 para los cocientes 1/2-1/5, respectivamente. Valores superiores a los mencionados se consideran anormales. Aplicando este tipo de análisis, el paciente R1 mostró valores superiores a los normales en los cocientes 1/2 y 1/3, el paciente R2 en los cocientes 1/4 y 1/5, mientras que R3 mostró valores normales en todos los cocientes. Aun cuando la disminución de los valores de la densidad es un hecho característico de la RP [7, 9], nuestros datos muestran además una alteración muy heterogénea del mfERG en los pacientes estudiados. Esto refleja una gran variabilidad en el grado de afectación de la

retina de los mismos.

En los pacientes R4-6, la mayoría de las respuestas de los hexágonos analizados mostraron una morfología anormal de aspecto polifásico. Así, sólo se encontraron respuestas con morfología bifásica en algunos hexágonos aislados y que variaron según los pacientes. Este tipo de registro multifocal refleja un estado avanzado de la enfermedad. La presencia de registros con ondas bifásicas en áreas dispersas de la retina indica una función preservada de los conos de dichas áreas. Las diferencias entre los pacientes de RP en la localización de áreas con funcionalidad preservada pueden deberse a la variabilidad interindividual de la densidad de conos en la retina. Así, se ha estimado que, en sujetos normales, la densidad de conos de la fovea varía entre 100.000 y 320.000 conos/mm<sup>2</sup> [4]. Además, pueden influir las variaciones debidas a una diferente degeneración de fotorreceptores asociada a la edad [14] y a la duración y gravedad de la enfermedad.

Aun cuando en la actualidad no existe tratamiento para la RP, diversas estrategias terapéuticas están siendo investigadas con el objetivo de frenar la evolución de la RP y/o restaurar la pérdida de visión [16]. Así, para la fase inicial de la enfermedad se están investigando diversas terapias génicas o farmacológicas que corrijan las alteraciones que las mutaciones causantes de la RP producen en el ciclo visual. Otras líneas de investigación tratan de evitar la muerte de los fotorreceptores mediante factores neurotróficos o antiapoptóticos que reduzcan la producción de sustancias retinotóxicas y que limiten el daño oxidativo. Finalmente, y para fases más avanzadas de la enfermedad, se están investigando las posibilidades terapéuticas de implantes de tejido retiniano o de células madre. En la mayoría de estos tratamientos se requiere la aplicación intraocular de cápsulas que liberen los agentes terapéuticos. En este sentido, cuando estos tratamientos estén disponibles para su aplicación en humanos, la identificación previa mediante mfERG de las áreas de actividad preservada y alterada en la retina de los pacientes de RP será clave para guiar la aplicación adecuada de la terapia elegida, así como para la evaluación posterior de su eficacia.

## **Conclusiones**

Nuestros resultados muestran, en primer lugar, que todos los pacientes estudiados presentan alteraciones en el registro obtenido mediante mfERG y, en segundo lugar, que existe una gran variedad interindividual en la topografía de las alteraciones retinianas. Este último aspecto deberá ser tenido en cuenta cuando, en un futuro, se comiencen a aplicar terapias en los pacientes con RP.

## **Agradecimientos**

*Agradecemos la financiación obtenida de fondos FEDER 2008. UNGR08-1E-011.*

## **Referencias**

1. Chang S, Vaccarella L, Olatunji S, Cebulla C, Christoforidis J. Diagnostic Challenges in Retinitis Pigmentosa: Genotypic Multiplicity and Phenotypic Variability. *Curr Genomics*. 2011; 12:267-275.
2. Fernández E. En: *Retinosis Pigmentaria: preguntas y respuestas*. Ed. Universidad Miguel Hernández de Elche. 2007.
3. González-del Pozo M, Borrego S, Barragán I, Pieras JI, Santoyo J, Matamala N, Naranjo B, Dopazo J, Antiñolo G. Mutation screening of multiple genes in spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa by targeted resequencing. *PLoS ONE* 2011; 6:1-8, e27894.
4. Hendrickson AE, Yuodelis C. The morphological development of the human fovea. *Ophthalmology* 1984; 91:603-612.
5. Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS, Marmor MF, McCulloch DL, Palmowski-Wolfe AM. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc Ophthalmol* 2012; 124:1–13.

6. Hood DC, Odel JG, Chen CS, Win BJ. The multifocal electroretinogram. *J Neuro-Ophthalmol* 2003; 23:225-235.
7. Janáky M, Pálffy A, Deák A, Szilágyi M, Benedek G. Multifocal ERG reveals several patterns of cone degeneration in retinitis pigmentosa with concentric narrowing of the visual field. *IOVS* 2007; 48:383–389.
8. Lyons JS, Severns ML. Detection of early hydroxychloroquine retinal toxicity enhanced by ring ratio analysis of multifocal electroretinography. *Am J Ophthalmol* 2007; 143:801-809.
9. Maiti A, Uparkar M, Natarajan S, Borse N, Walinjar J. Principal components' analysis of multifocal electroretinogram in retinitis pigmentosa. *Indian J Ophthalmol* 2011; 59:353-357
10. Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electroretinography. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc Ophthalmol* 1999; 97:143-156.
11. Moschos MN, Moschos MM, Apostolopoulos M, Mallias JA, Bouros C, Theodossiadis GP. Assessing hydroxychloroquine toxicity by the multifocal ERG. *Doc Ophthalmol* 2004; 108:47-53.
12. Nagy D, Schönfisch B, Zrenner E, Jägle H. Long-Term Follow-up of Retinitis Pigmentosa Patients with Multifocal Electroretinography. *IOVS* 2008; 49:4664-4671.
13. Pagon R, Daiger S. Retinitis Pigmentosa Overview. En: GeneReviews. Ed. Universidad de Washington. 2005, [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1417>].
14. Panda-Jonas S, Jonas JB, Jakobczyk-Zmija. Retinal photoreceptor density decreases with age. *Ophthalmology* 1995; 102:1853-1859.
15. Phelan JK, Bok D. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis* 2000; 6:116-124.
16. Sahni JN, Angi M, Irigoyen C, Semeraro F, Romano MR, Permezziani F. Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy. *Curr Genomics* 2011; 12:276-284.
17. Siemiatkowska A, Arimadyo K, Moruz LM, Astuti G, Castro-Miro M, Zonneveld MN. Molecular genetic analysis of retinitis pigmentosa in Indonesia using genome-wide homozygosity mapping. *Mol Vis* 2011; 17:3013-3024.
18. Sutter EE, Tran D. The field topography of ERG components in man-I: the photopic luminance response. *Vision Res* 1992; 32:433-446.

**Sintomatología gastrointestinal en la  
fibromialgia: frecuencia de presentación y  
posibles mecanismos patogénicos**

**J. L. Ordóñez Carrasco  
J. M. García Leiva  
E. Pita Calandre.**





# Sintomatología gastrointestinal en la fibromialgia: frecuencia de presentación y posibles mecanismos patogénicos.

Jorge L. Ordóñez Carrasco, Juan Miguel García Leiva, Elena Pita Calandre.

Instituto de Neurociencias. Centro de Investigaciones Biomédicas

Grupo de investigación CTS-502 de la Junta de Andalucía.

*En la práctica clínica se puede observar como los pacientes con fibromialgia, de manera frecuente, aquejan síntomas y signos gastrointestinales persistentes, en la mayoría de casos inespecíficos o difíciles de catalogar en una patología concreta. La literatura científica ha descrito, en diversas ocasiones, las características y frecuencia de síntomas gastrointestinales en estos pacientes y diversos estudios han observado la frecuente coexistencia del síndrome de intestino irritable en estos pacientes. Escasos trabajos han valorado otros signos y síntomas gastrointestinales inespecíficos en la fibromialgia. Actualmente se han propuesto algunos mecanismos patogénicos potencialmente responsables de esta sintomatología como pueden ser el sobrecrecimiento bacteriano en intestino delgado (SIBO), la alteración de la permeabilidad intestinal y la intolerancia al gluten.*

---

## **Introducción**

La fibromialgia (FM) es un síndrome crónico de etiología mal conocida caracterizado por dolor generalizado, sensibilidad muscular, disminución del umbral de dolor a la presión y otros estímulos, fatiga crónica y trastornos del sueño (insomnio y/o sueño poco reparador). Otros síntomas típicos de la fibromialgia son la rigidez matutina, la fatiga y los problemas cognitivos [1]. Sumado a todo esto, los pacientes con fibromialgia frecuentemente presentan síntomas y signos gastrointestinales, desconociéndose, de momento, si se trata de una patología gastrointestinal comórbida con la fibromialgia o si podría ser parte del espectro sintomatológico del propio síndrome fibromiálgico. El objetivo del presente trabajo consiste en realizar una revisión sobre las características y frecuencia de presentación de la sintomatología gastrointestinal en la fibromialgia, así como de sus posibles mecanismos etiopatogénicos.

## **2.Características y frecuencia de presentación.**

El primer estudio que describe la sintomatología gastrointestinal que acompaña a la fibromialgia fue publicado por Yunus et al. [2] en 1981, en el que se observó la alta frecuencia de síntomas gastrointestinales y su posible asociación con el síndrome de intestino irritable (una prevalencia del 34% en pacientes con fibromialgia en relación al 8% presente en controles sanos).

Un análisis más exhaustivo fue realizado por Triadafilopoulos et al. [3], en 1991, quienes analizaron los síntomas gastrointestinales que presentaban los pacientes con fibromialgia en comparación con otros dos grupos: enfermedad articular degenerativa y sujetos sanos. Los datos obtenidos fueron que el 73% de los pacientes con fibromialgia padecía alguna alteración de la función intestinal en comparación con el 37% de los pacientes con enfermedad articular degenerativa y ninguno en el grupo control( $P<0,001$ ). El 63% de los pacientes con fibromialgia padecía alternancia diarrea-estreñimiento en contraste con el 24% de los pacientes con enfermedad articular degenerativa y ninguno de los controles. Otros síntomas relevantes que se recogieron en el grupo de fibromialgia fueron gases abdominales (59%), náuseas (21%), diarrea (9%) y estreñimiento (12%). Asimismo se observó que el uso de laxantes era frecuente entre los pacientes con fibromialgia (19%) mientras que se hallaba prácticamente ausente en el resto de grupos. Otro dato destacable fue el empeoramiento de la sintomatología gastrointestinal en momentos de exacerbación de la enfermedad. La prevalencia de esta exacerbación fue descrita en el 50% de los pacientes con fibromialgia y en el 28% de los pacientes con enfermedad articular degenerativa.

La fibromialgia y el síndrome de intestino irritable son patologías que representan el 30% o más de las consultas de reumatología y gastroenterología. Un estudio de Veale et al. [4], en 1991, tuvo como objetivo comparar las condiciones clínicas entre cuatro grupos de pacientes: fibromialgia, síndrome de intestino irritable, artritis inflamatoria, y patología intestinal inflamatoria (provenientes de un diagnóstico de síndrome de Crohn o colitis ulcerosa). Estos grupos fueron comparados entre sí y respecto a otro grupo control de sujetos

sanos. Los resultados del estudio indicaron que el 70% de los pacientes con fibromialgia padecía síndrome de intestino irritable mientras que el 65% de los pacientes con síndrome de intestino irritable padecía fibromialgia. En la totalidad del grupo control, que incluía a los sujetos sanos, los enfermos con artritis y los enfermos con patología intestinal inflamatoria, únicamente el 12% de los sujetos presentaba fibromialgia y un 10% síndrome de intestino irritable. En conclusión, los resultados indicaron una frecuente coexistencia de ambas patologías y, aunque los mecanismos patogénicos comunes entre ambas patologías siguen sin ser claros, los autores sugieren examinar en futuros trabajos la eficacia de una dieta alta en fibra (de eficacia demostrada en pacientes con síndrome del intestino irritable) para pacientes con fibromialgia y de un plan de ejercicio y bajas dosis de amitriptilina (de eficacia demostrada en pacientes con fibromialgia) para pacientes con el síndrome de intestino irritable.

Posteriormente, Sivri et al. [5] avalaron la coexistencia del síndrome de intestino irritable con la fibromialgia comparando pacientes fibromiálgicos con sujetos sanos. Los resultados del estudio fueron que los síntomas asociados al síndrome de intestino irritable fueron referidos por el 41,8% de los pacientes en comparación con el 16% del grupo control ( $P < 0,05$ ). De manera más detallada, observaron que el 38,2% de los pacientes con fibromialgia padecía dolor abdominal más de 6 veces al año, el 45,5% presentó distensión abdominal, el 30,9% padecía sensación de evacuación incompleta, el 30,9% presentó estreñimiento y el 7,3% diarrea. Los autores concluyeron, al igual que el resto de autores anteriores, que la fibromialgia y el síndrome del intestino irritable coexisten frecuentemente y que podrían existir mecanismos patogénicos comunes a ambas patologías.

Una revisión realizada por Chang [6], en 1998, señaló que el 50% de los pacientes con fibromialgia padecía dispepsia funcional y un 70% experimentaba síntomas típicos del síndrome del intestino irritable. Además, analizó las semejanzas y diferencias entre los pacientes con fibromialgia que padecen síntomas gastrointestinales y pacientes con síndrome del intestino irritable, llegando a la conclusión de que la mayoría de ellos experimentan la

exacerbación de los síntomas gastrointestinales en periodos estresantes de la vida. Asimismo, ambos tipos de pacientes sufrían trastornos del sueño y fatiga, y el tratamiento con antidepresivos tricíclicos en bajas dosis y/o la psicoterapia mejoraban la sintomatología. A pesar de esta similitud, reflejó diferencias en las respuestas a la percepción somática y a los estímulos viscerales entre ambos grupos.

Un trabajo de Sperber et al.[7] analizó la coexistencia de fibromialgia en pacientes con síndrome de intestino irritable y viceversa, teniendo en cuenta cómo afecta a la calidad de vida la presentación de ambas patologías. Los resultados del estudio fueron que el 31,6% de los pacientes con síndrome de intestino irritable padecía fibromialgia en comparación con el 4,2% de los controles, en tanto que el 32% de los pacientes con fibromialgia sufría de intestino irritable. Respecto al cuestionario de calidad de vida, los pacientes que presentaban ambas patologías obtuvieron peores resultados en los ítems de bienestar global, alteración del sueño, frecuencia de visitas al médico, dolor, ansiedad y gravedad global que aquellos que padecían sólo una de ellas.

Kurland et al. [8] realizaron el primer estudio que investigó la frecuencia del síndrome de intestino irritable en pacientes con fibromialgia comparando los criterios diagnósticos de Roma I respecto a los de Roma II (establecidos estos últimos después de la modificación de 1999 para el diagnóstico de trastornos funcionales intestinales), utilizando como grupo control a pacientes afectados de otras patologías reumáticas. Encontraron que el 63% de los pacientes con fibromialgia, frente al 15% de los controles, padecía síndrome de intestino irritable bajo los criterios diagnósticos de Roma I, siendo las proporciones del 83% y del 16% respectivamente cuando se aplicaron los criterios diagnósticos de Roma II; las diferencias fueron estadísticamente significativas en ambos casos.

En 2009, Almansa et al. [9] evaluaron la sintomatología gastrointestinal presente en la fibromialgia y el papel potencial que ejercería al respecto el distrés psicológico. Para la evaluación de los pacientes se usaron dos cuestionarios: evaluación de trastornos funcionales gastrointestinales (criterios Roma II) para valorar la sintomatología gastrointestinal y SCL-90 para evaluar

trastornos psicológicos. Se evaluó a un grupo de pacientes con fibromialgia en comparación con otro de sujetos sanos. Los resultados fueron que todos los síntomas gastrointestinales analizados, a excepción de los vómitos, fueron más frecuentes en los pacientes con fibromialgia. El 98% de los mismos presentaron al menos uno de los trastornos funcionales gastrointestinales evaluados en comparación con el 39% de los sujetos control. El trastorno funcional que más se correlacionó en los pacientes con fibromialgia fue el síndrome del intestino irritable. Los pacientes con fibromialgia presentaron una puntuación más alta (estadísticamente significativa) en el SCL-90 en comparación con los controles, en especial los pacientes con incontinencia fecal.

Pamuk et al. [10] analizaron la sintomatología gastrointestinal de los pacientes con fibromialgia en relación con dos grupos: artritis reumatoide y sujetos sanos. Valoraron los datos teniendo en cuenta la alteración de la calidad de vida de los sujetos. El estudio aportaba datos que reflejaban un aumento de la severidad de síntomas como eructos, reflujo, distensión abdominal, sabor amargo y vómitos en el grupo de fibromialgia en comparación con los otros dos grupos ( $P < 0.01$ ). La dispepsia abdominal provocaba mayor alteración de la calidad de vida en los pacientes con fibromialgia comparándola con los otros dos grupos experimentales. La frecuencia de estreñimiento fue mayor en pacientes con artritis reumatoide (49%) que en la fibromialgia (29,6%) y los controles (23,3%), aunque se observó un incremento mayor de la alteración de la calidad de vida relacionada con el estreñimiento entre los pacientes con fibromialgia.

En resumen, en este apartado hemos podido observar como los pacientes con fibromialgia presentan una elevada frecuencia de sintomatología gastrointestinal. Diversos estudios, desde hace dos décadas, han señalado al síndrome de intestino irritable como la patología gastrointestinal más frecuente, postulándose que podrían tener un mecanismo patogénico común. Al repasar la literatura científica también podemos observar como se ha descrito otro tipo de sintomatología gastrointestinal inespecífica difícil de catalogar en un diagnóstico concreto.

### **3. Posibles mecanismos patogénicos**

Hasta el día de hoy, se desconoce el factor causal de las manifestaciones gastrointestinales que con tanta frecuencia aquejan a los pacientes afectos de fibromialgia. En los últimos años, sin embargo, se han apuntado algunos mecanismos patogénicos potenciales que a continuación se detallan.

#### **3.1. Sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (Small Intestinal Bowel Overgrowth, SIBO).**

El SIBO es un síndrome heterogéneo caracterizado por un incremento anormal del número de bacterias en el intestino delgado. La mayoría de los autores [11] consideran el diagnóstico del SIBO cuando hay más de 10<sup>5</sup> CFU/mL. (CFU: Unidad Formadora de Colonias: expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un mililitro de agua siendo el valor normal inferior a 10<sup>4</sup> CFU/mL. Dicho dato nos indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente).

Existen varios mecanismos de defensa endógena para prevenir el sobrecrecimiento bacteriano: la secreción gástrica de ácido, la motilidad intestinal, la válvula íleo-cecal, las inmunoglobulinas en la secreción intestinal y las propiedades bacteriostáticas tanto del páncreas como de la secreción biliar. La etiología del SIBO suele ser compleja y se puede presentar asociada a trastornos en los mecanismos protectores antibacterianos como la aclorhidria, la insuficiencia pancreática exocrina y los síndromes de inmunodeficiencia. También puede estar asociado a anomalías anatómicas y/o trastornos de la motilidad [11].

Entre las enfermedades que han sido relacionadas con el SIBO se incluyen: la aclorhidria [12], la insuficiencia exocrina pancreática [13-14], los síndromes de inmunodeficiencia [15-16], la obstrucción del intestino delgado [13,17-18], el síndrome del intestino irritable [19], el síndrome del intestino corto [20], la esteatohepatitis no alcohólica [21], la esclerosis sistémica [22], la

neuropatía autonómica en la diabetes mellitus [23-24], la enteropatía por radiación [25-26], la fibromialgia [27], la celiaquía [28], y la enfermedad de Crohn [29].

Los síntomas relacionados con el SIBO incluyen distensión abdominal, diarrea, mala absorción, pérdida de peso, flatulencias y desnutrición. En casos severos, lesión de hígado, anemias e hipocalcemia debido a una insuficiencia de vitamina D y otras; aunque también puede cursar de manera asintomática [11].

La prevalencia de SIBO en pacientes con fibromialgia fue evaluada en un trabajo de Pimentel et al. [27] quienes estudiaron a 123 pacientes con fibromialgia. En el 78% de los casos se encontró la presencia de SIBO. De estos últimos, 25 fueron sometidos a un tratamiento antibiótico tras el cual 11 de los sujetos experimentaron una erradicación completa y los 14 restantes una erradicación parcial del sobrecrecimiento bacteriano. En cuanto a la sintomatología clínica, 22 de los 25 pacientes refirieron una mejoría de síntomas gastrointestinales (distensión, estreñimiento, diarrea, gases intestinales y dolor abdominal). Este estudio sugiere que diversos síntomas gastrointestinales que frecuentemente presentan los pacientes con fibromialgia podrían deberse a un sobrecrecimiento bacteriano en intestino delgado. Además, valora la mejora de esta sintomatología por medio de un tratamiento farmacológico centrado en la erradicación del mismo.

Otro estudio posterior de Pimentel et al. [30] comparó a pacientes con síndrome de intestino irritable y pacientes con fibromialgia usando el test de hidrógeno en aire espirado para poder detectar un posible SIBO. Los resultados obtenidos fueron que el 100% de los pacientes con fibromialgia presentó alteraciones en el test de hidrógeno en aire espirado en comparación con el 84% de los pacientes con síndrome de intestino irritable ( $P < 0,05$ ). También destacaron la correlación entre el grado de dolor somático en pacientes con fibromialgia y el nivel de hidrogeno que presentaron en el test ( $r = 0,42$ ,  $p < 0,01$ ).



### **3.2. Alteración de la permeabilidad intestinal.**

La mucosa intestinal actúa como una barrera selectiva, que permite la absorción de los nutrientes presentes en el lumen y limita el acceso de patógenos, toxinas y antígenos de la dieta a la circulación sistémica [31-32]. La integridad de la barrera mucosa intestinal puede estar alterada en situaciones patológicas que se asocian con lesiones del epitelio. Tales alteraciones han sido detectadas en modelos animales de daño intestinal por agentes farmacológicos, nutricionales o infecciosos. En el ser humano, se han podido observar alteraciones de la permeabilidad intestinal en la desnutrición, la enfermedad celíaca, las patologías inflamatorias crónicas del intestino, el estrés, el SIBO y la gastroenteritis [33-34].

Pimentel et al. [30] llegaron a la conclusión de que existe correlación entre la intensidad del dolor en pacientes con fibromialgia y el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado. Este sobrecrecimiento, a menudo, se asocia a un aumento de la permeabilidad intestinal. Esta alteración de la permeabilidad intestinal tiene una relevancia fisiopatológica puesto que puede ser causa de una estimulación de las células inmunológicas y desempeñar un papel importante en las causas de algunas enfermedades inflamatorias intestinales, alergias y artritis [35]. Hasta ahora, el único estudio que ha valorado la permeabilidad intestinal en la fibromialgia fue realizado por Goebel et al. [36] quienes analizaron mediante un “test de tres azúcares” (sacarosa, lactulosa y manitol) el grado de absorción de los mismos para así poder obtener como resultado la permeabilidad a nivel gastroduodenal y del intestino delgado. El objetivo de este estudio fue determinar si existía una alteración de la permeabilidad intestinal en pacientes con fibromialgia, para lo que se evaluaron tres grupos: pacientes con fibromialgia, pacientes con síndrome de dolor regional complejo y sujetos sanos, considerándose tanto a los pacientes con síndrome de dolor regional complejo como a los sujetos sanos como grupos control. Contrariamente a lo esperado, los resultados del estudio evidenciaron la existencia de una alteración de la permeabilidad gastroduodenal e intestinal en ambas patologías, aunque no en

los controles sanos, concluyendo los autores que una alteración de la permeabilidad intestinal es un factor necesario pero no suficiente para provocar una respuesta inmunológica anormal por lo que habría que tener también en cuenta otros factores adicionales.

### **3.3 Intolerancia al gluten.**

La intolerancia al gluten en sujetos sin enfermedad celiaca ha creado controversia en el mundo científico y ha sido descrita como “la tierra de nadie” [37]. Pocos trabajos clínicos han evaluado adecuadamente el papel de gluten en enfermedad gastrointestinal. Hasta ahora, los estudios se han limitado a líneas celulares de cáncer y estudios en animales. En humanos, dos ensayos clínicos aportaron datos interesantes a una posible intolerancia al gluten sin ser celiaco. En el primer estudio clínico, Wahnschaffe et al. [38] observaron que la retirada del gluten de la dieta mejoraba la sintomatología gastrointestinal que presentaban sujetos sin celiaquía. Sin embargo, este estudio no fue controlado y, por otra parte, hubo un número de pacientes con alteraciones intestinales en la biopsia duodenal realizada; por lo tanto, no excluyó posibles celiaquías oligosintomáticas. A pesar de estas deficiencias, sus resultados sugieren que la intolerancia al gluten es una posibilidad real. En otro ensayo clínico, éste aleatorizado y a doble ciego, Biesiekierski et al. [39] estudiaron dos grupos con sujetos sin celiaquía (descartada ésta por tener los alelos DQ2 y DQ8 negativos o por biopsia duodenal) pero que habían notado que su sintomatología intestinal mejoraba con una dieta exenta de gluten que seguían habitualmente. Uno de los grupos fue expuesto a una dieta rica en gluten y otro a placebo. Los sujetos con dieta rica en gluten experimentaron una exacerbación de la sintomatología gastrointestinal en la primera semana de estudio, no observándose diferencias en la permeabilidad intestinal, en los anticuerpos celíacos y en la sensibilidad del PCR (Proteína C Reactiva).

Esta intolerancia al gluten, de la que la evidencia científica es limitada, ha sido revisada recientemente por E.D. Newnham [40], quien concluye que la

existencia de la intolerancia al gluten sin ser celiaco se muestra como una posibilidad muy real. Newnham refiere que en la práctica clínica se observa con frecuencia que la sintomatología gastrointestinal típica del síndrome del intestino irritable que presentan algunos pacientes sin marcadores positivos de enfermedad celíaca suele responder de manera beneficiosa a una dieta libre de gluten. Por último, concluye mencionando un estudio en curso (ACTRN12610000524099) en el que se valorará la patogénesis y el fenotipo clínico de la intolerancia al gluten.

Según el libro blanco de la enfermedad celíaca [41] la fibromialgia está considerada una enfermedad asociada a la celiaquía del adulto. Según Zipser et al. [42] la prevalencia de fibromialgia en pacientes con celiaquía del adulto es del 9%. En el sentido opuesto, no se han publicado estudios que hayan evaluado la prevalencia de celiaquía en los pacientes con fibromialgia. La elevada prevalencia de síntomas y signos gastrointestinales presentada por los pacientes con fibromialgia sugiere la posibilidad de que formas oligosintomáticas de la celiaquía del adulto o intolerancia al gluten sin celiaquía puedan ser responsables de al menos una parte de la sintomatología gastrointestinal presente en estos pacientes. De confirmarse este hecho, una dieta exenta de gluten podría ser beneficiosa en este subgrupo de pacientes.

## **4. Conclusiones**

Los resultados descritos por los estudios revisados demuestran que la existencia de signos y síntomas gastrointestinales es muy frecuente entre los pacientes con fibromialgia. No obstante, a excepción de aquellos trabajos que evalúan la comorbilidad con el síndrome de intestino irritable, pocos estudios analizan de manera exhaustiva otra sintomatología gastrointestinal inespecífica y que a menudo refieren los pacientes en la práctica clínica. Actualmente, los mecanismos patogénicos propuestos tienen una evidencia limitada debido a los escasos trabajos publicados pero constituyen un punto de partida para líneas futuras de investigación.

## **Referencias**

1. Smith HS, Barkin RL. Fibromyalgia syndrome: a discussion of the syndrome and pharmacotherapy. *Am J Ther.* 2010;17(4):418-39.
2. Yunus M, Masi AT, Calabro JJ, et al. Primary fibromyalgia (fibrositis): clinical study of 50 patients with matched controls. *Semin Arthritis Rheum.* 1981;11:151-71.
3. Triadafilopoulos G, Simms RW, Goldenberg DL. Bowel dysfunction in fibromyalgia syndrome. *Dig Dis Sci.* 1991;36(1):59-64.
4. Veale D, Kavanagh G, Fleiding JF, et al. Primary fibromyalgia and the irritable bowel syndrome: different expressions of a common pathogenetic. *Br J Rheumatol.* 1991;30(3):220-2.
5. Sivri A, Cindas A, Dincer F, et al. Bowel dysfunction and irritable bowel function in fibromyalgia patients. *Clin Rheumatol.* 1996;15(3):283-6.
6. Chang L. The association of functional gastrointestinal disorders and fibromyalgia. *Eur J Surg Suppl.* 1998;(583):32-6.
7. Sperber AD, Azmon Y, Neumann L et al. Fibromyalgia in the irritable bowel syndrome: Studies of prevalence and clinical implications. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(12):3541-6.
8. Kurland JE, Coyle WJ, Winkler A, et al. Prevalence of irritable bowel syndrome and depression in fibromyalgia. *Dig Dis Sci.* 2006;51(3):454-60.
9. Almansa C, Rey E, Sánchez RG, et al. Prevalence of functional gastrointestinal disorders in patients with fibromyalgia and the role of psychologic distress. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(4):438-45.
10. Pamuk ON, Umi H, Harmandar O. Increased frequency of gastrointestinal symptoms in patients with fibromyalgia and associated factors: a comparative study. *J Rheumatol.* 2009;36(8):1720-4.
11. Bures J, Cyriany J, Kohoutova D, et al. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *World J Gastroenterol.* 2010;16(24):2978-90.
12. Lewis SJ, Franco S, Young G, et al. Altered bowel function and duodenal bacterial overgrowth in patients treated with omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996;10:557-61.
13. Vanderhoof JA, Pauley-Hunter RJ. Etiology and pathogenesis of bacterial overgrowth. Available from: <http://www.uptodate.com/contents/etiology-and-pathogenesis-of-small-intestinal-bacterial-overgrowth>. Accedido el 3 de enero de 2012).
14. Trespi E, Ferrieri A. Intestinal bacterial overgrowth during chronic pancreatitis. *Curr Med Res Opin.* 1999;15:47-52
15. Belitsos PC, Greenson JK, Yardley JH, et al. Association of gastric hypoacidity with opportunistic enteric infections in patients with AIDS. *J*

- Infect Dis. 1992;166:277–84.
16. Pignata C, Budillon G, Monaco G, et al. Jejunal bacterial overgrowth and intestinal permeability in children with immunodeficiency syndromes. *Gut*. 1990;31:879–82.
  17. Kongara KR, Soffer EE. Intestinal motility in small bowel diverticulosis: a case report and review of the literature. *J Clin Gastroenterol*. 2000;30:84–6.
  18. Machado JD, Campos CS, Lopes Dah Silva C, et al. Intestinal bacterial overgrowth after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 2008;18(1):139–43.
  19. Mann NS, Limoges-Gonzales M. The prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome. *Hepatogastroenterology*. 2009;56(91- 92):718-21.
  20. Van Citters GW, Lin HC. Nutrition and gastrointestinal motility in health and disease. In: Buchman AL, editor. *Clinical Nutrition in Gastrointestinal Disease*. Thorofare: Slack Inc; 2006. pp. 271–80.
  21. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic esteatohepatitis. *Gut*. 2001;48:206–11.
  22. Domsic R, Fasanella K, Bielefeldt K. Gastrointestinal manifestations of systemic sclerosis. *Dig Dis Sci*. 2008;53:1163–74.
  23. Roza AM, Edmiston CE Jr, Frantzides C, et al. Untreated diabetes mellitus promotes intestinal microbial overgrowth. *Am J Surg*. 1992;163:417–21.
  24. Zietz B, Lock G, Straub RH, et al. Small-bowel bacterial overgrowth in diabetic subjects is associated with cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2000;23:1200–1.
  25. Husebye E, Skar V, Høverstad T, et al. Abnormal intestinal motor patterns explain enteric colonization with gram-negative bacilli in late radiation enteropathy. *Gastroenterology*. 1995;109:1078–89.
  26. Wedlake L, Thomas K, McGough C, et al. Small bowel bacterial overgrowth and lactose intolerance during radical pelvic radiotherapy: An observational study. *Eur J Cancer*. 2008;44:2212–17.
  27. Pimentel M, Chow EJ, Hallegua D, et al. Small intestinal bacterial overgrowth: A possible association with fibromyalgia. *J Musculoskelet Pain*. 2001;9(3).107-13.
  28. Rubio-Tapia A, Barton SH, Rosenblatt JE, et al. Prevalence of small intestine bacterial overgrowth diagnosed by quantitative culture of intestinal aspirate in celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43:157–61.
  29. Castiglione F, Del Vecchio Blanco G, et al. Orocecal transit time and bacterial overgrowth in patients with Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*. 2000;31:63–6.

30. Pimentel M, Wallace D, Hallegua D, et al. A link between irritable bowel syndrome and fibromyalgia may be related to findings on lactulose breath testing. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(4):450–2.
31. Sanderson IR, Walker WA. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology.* 1993;104:622-39.
32. Heyman M, Desjeux JF. Significance of intestinal food protein transport. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1992;15:48-57.
33. Bjarnason Y, Macpherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995;108:1566-81.
34. Behrens RH, Lunn PG, Northrop CA, et al. Factors affecting the integrity of the intestinal mucosa of Gambian children. *Am J Clin Nutr.* 1987;45:1433-41.
35. MacDonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005;307:1920–5.
36. Goebel A, Buhner S, Schedel R, et al. Altered intestinal permeability in patients with primary fibromyalgia and in patients with complex regional pain syndrome. *Rheumatology.* 2008;47:1223–7.
37. Verdu EF, Armstrong D, Murray JA. Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the “no man’s land” of gluten sensitivity. *The American Journal of Gastroenterology* 2009;104(6):1587–94.
38. Wahnschaffe U, Schulzke J, Zeitz M, et al. Predictors of clinical response to gluten-free diet in patients diagnosed with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:844–50.
39. Biesiekierski JR, Newnham ED, Irving PM et al. Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(3):508-14.
40. Newnham E.D. Does gluten cause gastrointestinal symptoms in subjects without coeliac disease? *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26 Suppl 3:132-4.
41. Rodrigo L. La enfermedad celíaca en el adulto. En: Polanco I, Coordinadora. El libro blanco de la enfermedad celíaca. Madrid: ICM; 2008. pp.29-41.
42. Zipser RD, Patel S, Yahya KZ, et al. Presentations of adult celiac disease in a nationwide patient support group. *Dig Dis Sci.* 2003;48(4):761-4.



## Capítulo 4

# Biomarcadores en la enfermedad de Parkinson

**S. Bandrés  
R. Durán  
F. Vives**





# Biomarcadores en la enfermedad de Parkinson

Sara Bandrés, Raquel Durán y Francisco Vives

Instituto de Neurociencias. Centro de Investigaciones Biomédicas  
Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina  
Universidad de Granada

*La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al control del movimiento voluntario, cuya causa es la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra (SNpc). Actualmente, el diagnóstico de la EP es fundamentalmente clínico, pero a pesar de que los signos y síntomas de la EP son bien conocidos, se calcula que alrededor de un 25% de los pacientes no están bien diagnosticados. Por esta razón, existe una necesidad creciente de búsqueda de biomarcadores que permitan por un lado, un diagnóstico precoz de la EP y por otro, que permitan seguir su progresión y diferenciarla de otras patologías relacionadas (parkinsonismos).*

*El encuentro de marcadores específicos para la EP ayudaría no solamente a su diagnóstico, sino además posibilitaría el desarrollo de terapias enfocadas a ralentizar, detener o prevenir la patología. El reciente descubrimiento de formas poligénicas de la enfermedad y el hallazgo de compuestos bioquímicos en el SNC y en tejidos periféricos que pueden reflejar la existencia de polimorfismos o los cambios que ocurren en la EP, ha incrementado el interés por el estudio de los posibles biomarcadores de esta enfermedad tan frecuente en personas mayores de 65 años.*

*La presente revisión bibliográfica pretende dar una visión detallada sobre los biomarcadores candidatos a nivel molecular investigados hasta el momento, evaluando críticamente la literatura más reciente.*

---

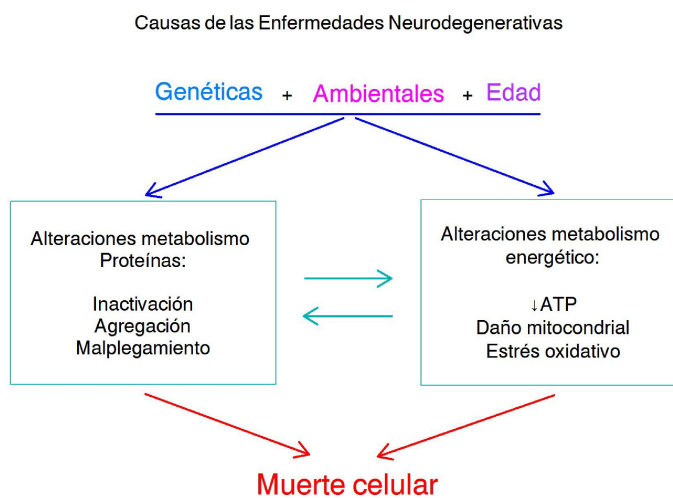
## **Introducción**

### **La Enfermedades neurodegenerativas**

El siglo XXI está siendo testigo de un envejecimiento poblacional importante, con una incidencia cada vez mayor en las sociedades más desarrolladas. Esto ha dado lugar a la llamada pirámide poblacional invertida y debido al continuo incremento del grupo de personas de edad avanzada, cada día son mayores las necesidades de más cuidados y mayor inversión sanitaria.

La calidad de vida en la población senil viene determinada en gran parte por la presencia o no de procesos patológicos relacionados con la edad, destacando las enfermedades caracterizadas por un daño neuronal acelerado, denominadas enfermedades neurodegenerativas. Estas patologías contribuyen, de forma importante, a la discapacidad en la población humana y constituyen un problema de salud creciente para el gasto sanitario de cualquier país [9].

Entre las enfermedades neurodegenerativas a las que se les está dedicando mayor atención cabe destacar por su alta incidencia la enfermedad de Alzheimer (EA) seguida por la enfermedad de Parkinson (EP). Otras enfermedades, como la esclerosis lateral amiotrófica, la demencia frontotemporal y la enfermedad de Huntington afectan a un número más reducido de pacientes, aunque todas ellas tienen unas consecuencias devastadoras sobre la salud.



**Figura 1: Causas de las Enfermedades Neurodegenerativas.** Los factores genéticos pueden causar o predisponer estas enfermedades. Los factores ambientales (tóxicos, pesticidas, fármacos, etc.), junto con las alteraciones propias de la edad, favorecen el desarrollo de este grupo de enfermedades en sujetos predispuestos.

## Enfermedad de Parkinson

La EP ocupa el segundo lugar de enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia y el primero entre las alteraciones que afectan al movimiento. Se observa con mayor frecuencia en edades por encima de los 60 años, afectando al 1% de esta población, proporción que aumenta con la edad [20]. En cuanto al sexo, no hay un claro predominio.

Numerosos estudios poblacionales han documentado que es más común

en los países industrializados, y más frecuente en Europa y América del Norte. Entre los factores ambientales conocidos que incrementan el riesgo de desarrollarla se encuentran la exposición crónica a productos químicos industriales, hidrocarburos, manganeso, pesticidas o herbicidas y consumo de agua de pozo entre otros.

Clínicamente, se caracteriza por presentar una serie de síntomas cardinales como bradiquinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural. Un gran número de pacientes sufren también de alteraciones del sistema nervioso autónomo, cognitivas y psiquiátricas [47]. Los principales síntomas derivan de una pronunciada y selectiva pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc. Patológicamente se caracteriza por la presencia de unas inclusiones citoplasmáticas formadas principalmente por agregados de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -syn) y ubiquitina, que forman los denominados cuerpos de Lewy (CL) y por la presencia de las neuritas distróficas o de Lewy [16].

Aunque la etiología de la EP es desconocida en gran parte, entre los principales factores postulados que contribuyen a la neurodegeneración se incluyen estrés oxidativo, agregación proteica, disfunción de las rutas del proteosoma, alteración mitocondrial y activación de los factores inflamatorios [2]. Los factores genéticos están tomando cada vez más relevancia, hablaremos de ellos posteriormente.

Existen tres presentaciones de la EP: esporádica, familiar e iatrogénica. La EP esporádica es la variedad más frecuente, constituyendo el 95% de los casos. Los expertos postulan que podría

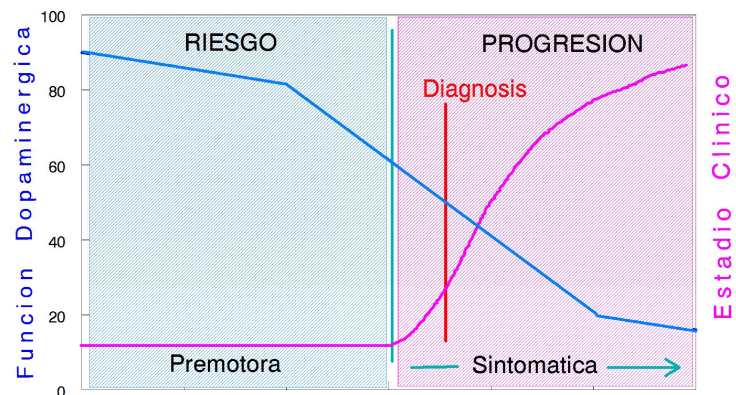


Figura 2. Gráfica de la progresión de la enfermedad de Parkinson. En la fase premotora va disminuyendo el número de células por la progresiva muerte neuronal, pero diversos mecanismos de compensación evitan la aparición de síntomas motores. Cuando la pérdida neuronal es elevada (60-70%) comienzan las alteraciones motoras (fase sintomática).

responder a un patrón poligénico multifactorial, en el que la interacción entre genes de riesgo y la exposición a factores ambientales podría explicar su etiología, al menos en parte. Tanto en la variedad familiar como en la esporádica el fenotipo es el mismo, aunque la heterogeneidad clínica de los pacientes podría deberse al efecto acumulativo de diferentes interacciones génicas-ambientales y/o intragénicas. La EP familiar afecta al 5-10% de los casos y tiene un origen genético, con patrones de herencia dominantes y recesivos. Desde la descripción de la enfermedad en el siglo XIX, varias observaciones han puesto de manifiesto agrupamiento familiar en los pacientes que padecen esta patología. Una de las primeras fue realizada por Gowers, quien reconoció que existía una mayor prevalencia de la enfermedad entre los parientes de enfermos de Parkinson [60]. Por último, la EP iatrogénica aparece como un efecto adverso tras la administración de determinados fármacos o la exposición a neurotóxicos, incluyendo herbicidas y pesticidas.

## **Biomarcadores**

Un biomarcador es un indicador de un estado biológico, una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica.

En las enfermedades del sistema nervioso, los biomarcadores pueden clasificarse en: clínicos, proteómicos, bioquímicos, genéticos y de neuroimagen (Biomarkers Definition Working Group). Además, por su origen biológico podemos englobarlos en biomarcadores procedentes del LCR, sangre, saliva, orina y otros fluidos. Deben ser objetivos, económicos, accesibles y fácilmente cuantificables, y que se correlacionen con la presencia o con la severidad de la enfermedad neurodegenerativa [29].

## **Biomarcadores en la Enfermedad de Parkinson**

La EP tiene una progresión lenta, y las primeras manifestaciones clínicas aparecen cuando la pérdida neuronal ha alcanzado aproximadamente un 70% [62].

Por tanto, el diagnóstico se realiza muchos años después del comienzo del proceso neurodegenerativo. Debido a ello, una estimación fiable del inicio de la patología resulta compleja, entre otras cosas porque el tejido afectado no puede examinarse por biopsia. Por estas razones, las investigaciones actuales se centran en la búsqueda de biomarcadores que permitan un diagnóstico diferencial y precoz de la enfermedad, así como nuevas percepciones sobre la etiología y su patogénesis. Es de absoluta necesidad contribuir a un mejor diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, proporcionar un mejor conocimiento sobre las rutas moleculares que subyacen a la patología y mejorar las terapias antiparkinsonianas.

En el caso de la EP, los biomarcadores deben relacionarse estrictamente con la neuropatología y los mecanismos causantes de la neurodegeneración, correlacionarse con su progresión evaluada mediante escalas clínicas, permitir el seguimiento del estado actual de la patología y estar preclínicamente validados y confirmados por al menos dos estudios independientes, dirigidos por investigadores cualificados que previamente hayan publicado sus resultados (The German Society of Experimental and Clinical Neurotherapeutics).

Hasta la fecha no hay biomarcadores útiles y clínicamente validados para la EP, salvo en el caso de las formas monogénicas (mutaciones), en las que al menos los rasgos subyacentes de la enfermedad pueden ser inequívocamente determinados por análisis genético. Sin embargo, incluso en estos pacientes, la relación entre el biomarcador y el desarrollo de la enfermedad es compleja, debido a la variabilidad de la penetrancia [29]. La dificultad de la búsqueda se acentúa cuando los pacientes son seleccionados con criterios clínicos, ya que son etiológicamente muy heterogéneos y presentan manifestaciones clínicas muy variadas, tanto en el inicio como en la progresión de la enfermedad [76].

Teniendo en cuenta que las características neuropatológicas entre los casos familiares y esporádicos de EP son muy similares, los cambios moleculares que ocurren en la EP familiar serán probablemente similares a los que ocurren en la EP esporádica. De ahí que dichas moléculas se hayan considerado como biomarcadores candidatos de la forma esporádica. En resumen, las alteraciones génicas, junto con factores ambientales, pueden causar la modificación de compuestos orgánicos existentes o la aparición de nuevas moléculas, que pueden analizarse en sangre y otros fluidos corporales pudiendo ser utilizados como biomarcadores. A continuación, se exponen los principales candidatos investigados hasta el momento que reflejan cambios a nivel molecular.

## **Biomarcadores bioquímicos**

### **Marcadores de estrés oxidativo**

Existen numerosas evidencias que relacionan los fenómenos de estrés oxidativo con la EP. Sin embargo, aún se desconoce el papel que juega en la neurodegeneración, bien como evento primario que actúa desencadenando el proceso de muerte neuronal o bien como consecuencia de la interacción de otros procesos moleculares. Lo que parece claro es que participa en la propagación del daño neuronal, oxidando lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, promoviendo la activación glial, fenómenos inflamatorios y activando rutas de señalización intracelular que conducen a la apoptosis [3].

Una de las principales fuentes de radicales libres es la mitocondria. Cuando se desacopla el transporte electrónico en la cadena respiratoria, la producción de ATP disminuye y con él las defensas antioxidantes, aumentando la concentración de radicales libres. Estos cambios se deben fundamentalmente a un déficit del complejo I mitocondrial, que es extremadamente vulnerable al daño oxidativo que ocurre de forma destacada en la SNpc de los pacientes con EP [61].

Los marcadores de estrés oxidativo han mostrado que en la sangre de enfermos con EP hay o bien una producción de radicales libres aumentada o un fallo en los mecanismos de defensa en contra del daño oxidativo [48]. Cuando existe este desequilibrio, se produce la muerte de las células más sensibles, como es el caso de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Aunque el estrés oxidativo no puede medirse en el SNC, la determinación periférica de compuestos oxidados refleja el estado general del organismo. Además, el seguimiento de los peróxidos circulantes puede utilizarse como índice de la eficacia del tratamiento en cuanto al estrés oxidativo, que como se ha dicho, es un importante factor etiopatogénico en la EP.

Los marcadores para la evaluación del estrés oxidativo se dividen en varias categorías: radicales libres, productos de la peroxidación del ADN, lípidos y proteínas, enzimas antioxidantes y sustancias antioxidantes de bajo peso molecular [21].

### *Radicales libres*

Ihara y cols., [37] encontraron un incremento en la concentración de radicales hidroxilo en el plasma de pacientes con EP. Otras especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno se han detectado en la SNpc y putamen de enfermos de Parkinson. Si bien, la mayor parte de los estudios se han centrado en determinar los compuestos orgánicos peroxidados que se detallan a continuación.

### *Compuestos oxidados*

#### ADN: 8-OHdG

La 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) es un producto procedente del daño oxidativo del ADN. De entre los diferentes marcadores de ADN oxidado es el más frecuentemente analizado por su relación con la susceptibilidad a padecer alguna enfermedad neurodegenerativa [45]. Muchos estudios reflejaron niveles aumentados de 8-OHdG en SNpc, suero, orina y LCR de sujetos con EP [49, 59] apoyando la idea de que la habilidad para reparar el ADN dañado podría verse



comprometida a medida que avanzaba la enfermedad.

No obstante, la mayor parte de las investigaciones no tuvieron en cuenta los niveles intracelulares de 8-OHdG ni tampoco controlaron los posibles factores de confusión. Se ha sugerido que la presencia de 8-OHdG en orina podría ser debida a la oxidación de GTP y no necesariamente indicar daño intracelular. Además, parece ser un biomarcador no específico de la EP ya que ha sido descrito en otras enfermedades neurodegenerativas [11].

### Lípidos: LPO y MDA

Uno de los fenómenos más estudiados es la peroxidación lipídica. Las neuronas son especialmente vulnerables a este fenómeno, ya que poseen una mayor tasa de consumo de oxígeno debido a la respiración mitocondrial incrementada y presentan niveles bajos de defensas antioxidantes. Además, sus membranas contienen una gran concentración de lípidos poliinsaturados y colesterol, macromoléculas con mayor predisposición a oxidarse [57]. Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc tienen además esta susceptibilidad aumentada, ya que durante el metabolismo de la dopamina y de la neuromelanina (uno de sus metabolitos), se liberan grandes cantidades de peróxido de hidrógeno, que por la presencia de hierro y por una reacción tipo Fenton, se convierte en radicales hidroxilo, potenciando la peroxidación lipídica en la membrana y la muerte celular [45].

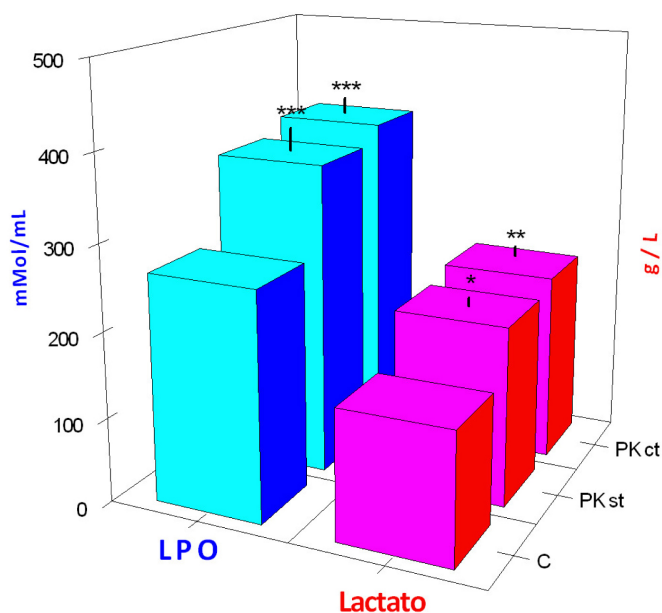


Figura 3. Concentraciones plasmáticas de lípidos peroxidados (LPO) y lactato; C: Controles; PKst: Grupo de pacientes con EP sin tratamiento; PKct: Grupo de pacientes con EP con tratamiento. Diferencias respecto a controles; Media  $\pm$  S.E.M \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

### Lípidos peroxidados (LPO)

Niveles incrementados de LPO se han descrito en sangre periférica de pacientes con EP [23] tanto recién diagnosticados como sometidos a tratamiento con respecto a controles [1], observándose que fueron muy similares tanto en el grupo tratado como en el no tratado (recién diagnosticado), por lo que podemos deducir que los fenómenos de estrés oxidativo suceden y son importantes desde estadios iniciales de la enfermedad y la terapia antiparkinsoniana no modifica dicho estado oxidativo.

### MDA

El malonil-dialdehído (MDA) es un producto de la degradación metabólica de los lipoperóxidos. Concentraciones elevadas fueron observadas en el LCR [38] y plasma de pacientes con EP [73]. Recientemente, se han encontrado niveles disminuidos de este parámetro en pacientes con EP avanzada tratados con dosis altas de levodopa sugiriendo un papel protector del fármaco [12].

### Proteínas

Las proteínas resultan dañadas e inactivadas irreversiblemente por medio de radicales libres. Son marcadas para su degradación en los proteosomas, pero pueden escapar de ello formando agregados de gran tamaño que van acumulándose y saturando las vías de degradación. La cantidad de grupos carbonílicos existentes en una proteína es utilizada como marcador del daño oxidativo.

Algunas investigaciones han descrito una mayor concentración de lipoproteínas alteradas en plasma y LCR de pacientes con EP tratados [8].

### *Enzimas antioxidantes*

#### SOD

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del ion superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, luchando frente al estrés oxidativo. Marttila y cols., [43] describieron un aumento de su actividad en la SNpc de enfermos de

Parkinson, y Kushleika y cols. [40] detectaron un aumento significativo en la expresión de una de sus isoformas en linfocitos de pacientes que consumieron selegilina frente a aquellos que no la consumieron, sugiriendo un papel neuroprotector del fármaco. Estudios posteriores mostraron que la actividad de la SOD era normal en el LCR y eritrocitos de pacientes con EP [67], aunque en los últimos años se ha encontrado un incremento de su actividad sugiriendo una regulación positiva antioxidante para mantener el balance redox [4].

#### Glutation peroxidasa (GPx)

Es una de las principales enzimas antioxidantes celulares. Su concentración se ha visto disminuida en cerebros postmortem [35] y su actividad atenuada en sangre periférica de enfermos de Parkinson [12], mientras que resultados contradictorios han sido obtenidos en otros estudios [64, 67].

Una de las posibles explicaciones del incremento de GPx en estos enfermos podría deberse a que la mayor parte de ellos se encontraban en fases tempranas de la patología, pudiendo deberse a mecanismos compensatorios.

Por otro lado, en modelos animales tratados con el tóxico 6-hidroxidopamina, la expresión de la GPx en las neuronas dopaminérgicas demostró un efecto protector [58].

#### Catalasa

Es una enzima que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Puesto que el peróxido de hidrógeno es catabolizado principalmente por la glutacion peroxidasa en el SNC, no ha sido muy estudiada en la EP [4].

#### *Sustancias antioxidantes:*

##### Ácido úrico

El ácido úrico (AU) es un producto del metabolismo de las purinas. Coexiste en los líquidos extracelulares en forma de urato y se le ha atribuido una función antioxidante y neuroprotectora. Hay una fuerte correlación entre la

concentración en el suero y en el LCR, siendo en el LCR un 7% > a la que existe en el suero [53]. Un número creciente de estudios han correlacionado elevados niveles de AU en suero con bajo riesgo de desarrollar EP y un favorable índice de progresión de la enfermedad, indicando que el AU podría ser un importante biomarcador en la patofisiología que subyace a la EP y sus distintos estadios [15, 75]

Dos estudios cohorte basados en 2 tipos de poblaciones distintas revelaron que la hiperuricemia jugaba un papel protector en el desarrollo de la EP [18, 19]. No obstante, hay que destacar que las concentraciones de AU en sangre son muy dependientes de los hábitos alimenticios y del consumo de alcohol.

### Vitaminas

Los investigadores han examinado el papel de los antioxidantes de la dieta en la protección frente a la EP.

Se ha propuesto que la ingesta de alimentos ricos en vitamina A, E y C en altas cantidades podría reducir el riesgo de padecer la enfermedad o enlentecer su curso. Sin embargo, hasta el momento los resultados obtenidos son dispares y controvertidos [10]

## **Marcadores de disfunción mitocondrial**

### *Lactato*

La disrupción del metabolismo aeróbico promueve la formación de lactato (LAC) fuera de la mitocondria a partir de piruvato, reduciendo el aporte energético. En base a ello, la determinación plasmática de LAC se ha considerado como un marcador útil de disfunción mitocondrial.

Nakagawa-Hattori y cols. [50] analizaron su concentración y el índice LAC/piruvato en LCR de pacientes con EP encontrando niveles aumentados pero no significativos. Un reciente estudio ha demostrado niveles aumentados de LAC tanto en pacientes con EP recién diagnosticados como sometidos a tratamiento con respecto a sus controles [23].

## **Marcadores de neuroinflamación**

La implicación de la inflamación en la patogénesis de la EP fue sugerida inicialmente por McGeer y cols. [44] al describir la presencia de microglía activa en cerebros de sujetos con EP. Además, la observación de que los pacientes tratados con AINES presentaban un riesgo 45% menor de sufrir EP, ha corroborado la presencia de fenómenos inflamatorios en la patología.

Trabajos posteriores demostraron niveles incrementados de citoquinas proinflamatorias en el plasma, LCR, SNpc, estriado y otras estructuras de los ganglios basales de pacientes con EP [72, 22].

Por otro lado, modelos experimentales de la EP han mostrado que si se atenúa la activación de la microglia se puede proteger el 90% de las neuronas dopaminérgicas que en otro caso hubieran iniciado procesos de apoptosis [70]. No obstante, el hecho de que la neuroinflamación se haya considerado como un sello histopatológico presente en otras enfermedades neurodegenerativas [68] y que los resultados comentados no se hayan correlacionado con el estadio de la enfermedad, hace que actualmente los marcadores inflamatorios no sean reconocidos como biomarcadores específicos.

## **Biomarcadores proteómicos**

### **$\alpha$ -Sinucleína ( $\alpha$ -syn)**

Estudios histológicos mostraron que la  $\alpha$ -syn es el principal componente de las inclusiones intracitoplasmáticas de los CL [34]. Su presencia en las neuronas de la SNpc supervivientes ha confirmado la enfermedad a nivel patológico y se han considerado como el marcador molecular más característico.

Su función no se conoce por completo, pero por su localización a nivel de las membranas sinápticas, parece que interviene en la neurotransmisión y en el tráfico vesicular. El mecanismo por el cual los agregados de  $\alpha$ -syn ejercen un

papel neurotóxico sigue siendo desconocido. Se ha visto que la inhibición del complejo I mitocondrial conduce a la acumulación de inclusiones de  $\alpha$ -syn, [47]. Otro mecanismo propuesto es la interacción de la proteína con la membrana mitocondrial, induciendo la liberación del citocromo c, lo que estimula la actividad de la óxido nítrico sintasa que favorece el incremento de peroxinitritos que oxidan y modifican a la membrana [54]. Por otro lado, la acumulación y la agregación de la  $\alpha$ -syn, origina un estrés proteolítico que posiblemente conlleve a un fallo en la función del complejo ubiquitin proteosoma, un sistema intracelular esencial para la eliminación no lisosomal de proteínas de vida corta, mal plegadas o mutantes, exacerbando la patología [47]. Además, se ha observado una disminución en la expresión de las subunidades de dicho complejo en la SNpc de pacientes con EP [14].

La importancia de la proteína a nivel diagnóstico llevó a los investigadores a identificarla en fluidos biológicos y tejidos periféricos. En condiciones fisiológicas, la  $\alpha$ -syn se encuentra en niveles altos en cerebro y en sangre y más bajos en LCR. Borghi y cols., [7] identificaron una forma monomérica con anticuerpos anti- $\alpha$ -syn en LCR de enfermos de Parkinson, sin encontrar diferencias significativas. En contraposición, se ha descrito un descenso en los niveles de la proteína en el LCR [48], observándose una fuerte correlación inversa entre los niveles de  $\alpha$ -syn y la severidad de la EP [69].

La caracterización de la  $\alpha$ -syn en sangre periférica también ha sido interpretada por distintos grupos, llegando a resultados controvertidos. Las investigaciones demostraron que esta proteína es abundante en plaquetas y que el 90% de los eritrocitos la expresan [51], pudiendo ser la concentración de  $\alpha$ -syn circulante paralela a la que hay en el cerebro, ya que los factores de transcripción GATA-1 del gen SNCA son los mismos en la eritropoyesis y en la SNpc [63]. El-Agnaf y cols. [27] observaron que la  $\alpha$ -syn estaba incrementada en suero de pacientes con EP, sugiriendo que podría tener una especificidad del 85% para detectar la enfermedad. Sin embargo, otros estudios no se corresponden con lo anterior [41].

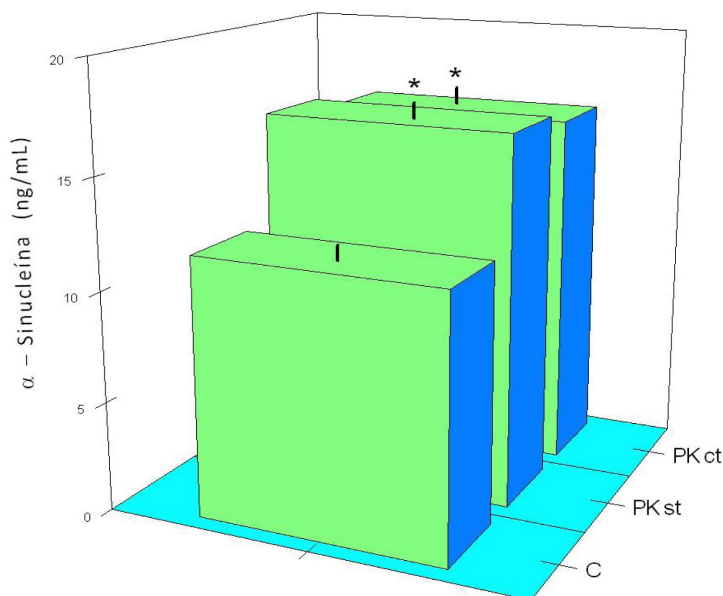
Varios factores podrían ser los responsables de dichos resultados

conflictivos, incluyendo variaciones en la detección, sensibilidad y precisión de cada experimento. Es posible que los distintos anticuerpos empleados en los diferentes ensayos detecten distintas especies de proteínas, o bien que la hemoglobina actúe como factor contaminante de las muestras analizadas interfiriendo en los resultados.

Con respecto a la progresión de la EP, no hay evidencias consistentes de

que estos niveles cambien en el curso de la enfermedad [36]. No obstante, la elevación de la proteína en fases iniciales de la enfermedad, hace que su determinación tenga valor diagnóstico [24]. Hay sugerencias de que la  $\alpha$ -syn podría ser usada para distinguir la EP de otros desórdenes de movimiento y demencias [46], pero el poder discriminatorio es limitado. A día de hoy, no se puede proponer la  $\alpha$ -syn como biomarcador específico puesto que no se ha estudiado en profundidad en otras enfermedades neurológicas.

Estudios más actuales están tratando de distinguir las formas normales de las patológicas (fosforiladas y agregadas). Se ha propuesto que la  $\alpha$ -syn fosforilada podría ser un biomarcador de la EP. En los CL, el 90% de la  $\alpha$ -syn está fosforilada en Ser-129 y en el cerebro normal esta proporción es del 4% [28].



**Figura 4. Concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -sinucleína. C: Controles; PKst: Grupo de pacientes con EP sin tratamiento; PKct: Grupo de pacientes con EP con tratamiento. Diferencias respecto a controles; Media  $\pm$  S.E.M \*\*, P < 0,05.**

**DJ-1**

Es un oncogen que da lugar a una proteína multifuncional involucrada en varios procesos celulares incluyendo la respuesta al estrés oxidativo. Desde el descubrimiento de que existía una asociación sus mutaciones y formas familiares recesivas de EP [39], las investigaciones han ido encaminadas al posible papel de esta molécula en la patogénesis.

Varios estudios argumentaron niveles aumentados en cerebro, LCR y plasma de pacientes con EP [13, 71]. Sin embargo, también existen resultados contradictorios en la literatura reciente [36].

**Otros biomarcadores proteómicos**

La investigación está progresando en distintas direcciones en búsqueda de nuevos biomarcadores proteómicos de utilidad. Entre ellos podemos destacar: la fractalkina (un marcador de inflamación), el ligando Flt3, el péptido  $\beta$ -amiloide1-42, ( $A\beta$ 1-42), la proteína tau fosforilada, la proteína tau total y factores de crecimiento como el insulin-like (IGF-1), observándose correlaciones con la severidad y la progresión de la EP [65, 32].

**Biomarcadores genéticos**

Históricamente, la EP fue considerada como una patología sin causas genéticas, hasta que estudios en familias de diferentes regiones geográficas del mundo fortalecieron la hipótesis de que tiene un sustrato genético importante. Se han identificado varios genes como causa de la EP hereditaria, de manera autosómica dominante y recesiva [30]. Hasta el momento, más de 14 genes se han reconocido como responsables de formas mendelianas de la EP. Estas formas monogénicas afectan a un número reducido de pacientes y probablemente en el futuro seguirán siendo minoritarias ya que el número global de pacientes con EP esporádica representa la gran mayoría de los afectados por la EP.



El diagnóstico genético es una técnica poco utilizada en la práctica clínica. El screening genético en pacientes con EP de aparición temprana, puede confirmar la EP familiar en casos muy concretos en los que las mutaciones son conocidas, pero este grupo solo supone una pequeña proporción. A pesar de ello, en el campo de la investigación tiene un papel muy importante. Diferentes estudios de asociación genética han intentado identificar polimorfismos que pueden relacionarse con el riesgo para padecer EP. Los marcadores genéticos tienen un alto potencial diagnóstico, ya que pueden proporcionar información sobre la predisposición genética a padecer EP. Esto permitiría estratificar los distintos fenotipos de la enfermedad, comprendiendo así las implicaciones clínicas de cada variante génica. Además, facilitaría conocer con mayor profundidad los mecanismos moleculares que subyacen a la enfermedad.

A continuación se describen aquellos genes que presentan una mayor relevancia actual como biomarcadores candidatos.

## **SNCA**

El hecho de que la proteína codificada por este gen, la  $\alpha$ -syn sea el mayor componente fibrilar de los CL da idea de la importancia de sus alteraciones. Se han descrito varias mutaciones puntuales además de duplicaciones y triplicaciones tanto en familias [56] como en casos esporádicos de EP [53]. Hasta el momento, múltiples GWAS han confirmado que se trata de un factor de riesgo para EP [33, 66] y que de alguna manera, existe una correlación con sus distintos fenotipos.

## **LKKR2**

Codifica la proteína kinasa 2, también llamada dardarina, a la que se le han atribuido múltiples funciones como la unión a sustratos específicos para la ubiquitinación, el tráfico vesicular y la interacción con otras proteínas [6]. Algunas de las mutaciones parecen dar lugar a un aumento de la actividad kinasa, lo que explicaría la fosforilación de la  $\alpha$ -syn y la proteína tau, alterando sus conformaciones y funciones [31]. Las mutaciones que se han encontrado son de

particular interés, debido a que son muy comunes, localizadas en un 10-15% de los casos familiares y en un 1-2% de los casos esporádicos de la EP [30].

## **MAPT**

Codifica la proteína tau, que se expresa abundantemente en neuronas y juega un papel fundamental en la organización y el mantenimiento de la estructura celular [55]. El gen MAPT fue inicialmente asociado a la patogénesis de las llamadas taupatías [5]. Puesto que la EP comparte algunas características clínicas con las taupatías, una serie de estudios se han encaminado a determinar la relación entre las variantes de MAPT y el riesgo para padecer EP. Un meta-análisis de 18 estudios encontró un odds ratio de 1.40 para desarrollar EP entre los individuos portadores del gen [74]. Recientes GWAS han descrito varios SNPs en equilibrio de ligamiento con el haplotipo H1, encontrándose una fuerte asociación con la EP [26]. Sin embargo el mecanismo por el cual las variaciones en MAPT influyen en una enfermedad en la que los agregados de tau son raramente encontrados, está aún por determinar. Parece ser que tau tiende a formar agregados y a interactuar con la  $\alpha$ -syn asociándose con un mayor riesgo para desarrollar EP.

## **GBA**

Codifica la enzima glucocerebrosidasa, cuya mutación conlleva a una pérdida de su función resultando en enfermedad de Gaucher (EG). Recientemente, han sido descritas algunas mutaciones en pacientes con EG que desarrollaron parkinsonismo. Como consecuencia de estas observaciones, se han llevado a cabo estudios orientados a determinar si las mutaciones en GBA constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de EP, identificándose diversas variantes implicadas en la EP [25].

Aunque el mecanismo que implica a este gen en la patogénesis de la EP no se conoce en profundidad, distintas hipótesis han sido propuestas. De alguna manera, las mutaciones en GBA resultarían en un plegamiento erróneo de la glucocerebrosidasa, la cual induciría a la disfunción lisosomal y dañaría las rutas

autofágicas necesarias para la degradación de la  $\alpha$ -syn, contribuyendo a la neurodegeneración [17].

## **Conclusiones y perspectivas futuras**

Actualmente, el tratamiento de la EP mejora la calidad de vida de los pacientes paliando en gran medida los síntomas motores y en menor grado los no motores. Sin embargo, aún no se ha conseguido un tratamiento efectivo que mejore la evolución de la enfermedad actuando sobre su base etiopatogénica, por lo que una vez iniciada, la enfermedad sigue progresando inexorablemente. Los estudios sobre los distintos aspectos etiológicos de la EP nos están proporcionando las bases para la búsqueda de biomarcadores que podrían resultar instrumentos útiles para la creación de nuevas estrategias terapéuticas. El hallazgo de biomarcadores específicos sería una gran ayuda, ya que permitiría identificar a los individuos en la fase premotora de la patología y seguir su progresión, discriminar con certeza la verdadera enfermedad de Parkinson idiopática respecto a otras patologías que manifiestan síntomas parecidos, estratificar los distintos fenotipos que encierra la EP y evaluar la influencia que tiene el tratamiento sobre los pacientes.

Como resultado del conjunto de trabajos revisados, se puede concluir que debido a la complejidad que encierra la EP, lo más probable es que no exista un único biomarcador, sino más bien varios cuya coincidencia permitiría establecer un diagnóstico precoz y diferencial de la enfermedad. Algunos autores han propuesto que la combinación de varios biomarcadores, mediante un algoritmo de cribado, sería la fórmula de combinarlos para que tuvieran valor diagnóstico. Se sugiere que para encontrar biomarcadores útiles en fase premotora, se necesitaría un banco con muestras de población sin sintomatología y un análisis a posteriori de las muestras tomadas en la fase asintomática de los pacientes que finalmente padecen EP.

## **Referencias**

1. Agil A, Durán R, Barrero F, Morales B, Araúzo M, Alba F, Miranda MT, Prieto I, Ramírez M, Vives F. Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2006; 240: 31-36.
2. Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, Schapira AH. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol.* 2010 Dec;67(12):1464-72.
3. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience* 2004; 5:S18-S25.
4. Baillet A, Chantepredrix V, Trocmé C, Casez P, Garrel C, Besson G. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2010 Oct;35(10):1530-7.
5. Baker MG. Depression, psychosis and dementia in Parkinson's disease. *Neurology.* 1999;52(7 Suppl 3):S1.
6. Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010 Dec;23(4):228-42.
7. Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, Abbruzzese G, Tabaton M. Full length  $\alpha$ -synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neuroscience Letters* 2000; 287:65-67
8. Buhmann C, Arlt S, Kontush A, Möller-Bertram T, Sperber S, Oechsner M, Stverenburg HJ, Beisiegel U. Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication. *Neurobiology of disease.* 2004; 15: 160-170.
9. Catalá-López F, García-Altes A, Álvarez-Martín E, Génova-Maleras R, Morant-Ginestar C. Evaluación económica sobre enfermedades neurológicas y mentales en España: revisión sistemática y análisis comparativo. *Rev Neurol.* 2011; 52: 65-71.
10. Chen CM, Liu JL, Wu YR, Chen YC, Cheng HS, Cheng ML, Chiu DT. Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009 Mar;33(3):429-35. doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.011.
11. Chen JJ, Swope DM. Pharmacotherapy for Parkinson's disease. *Pharmacotherapy.* 2007 Dec;27(12 Pt 2):161S-173S.
12. Chen JJ. Parkinson's disease and other movement disorders. *Am J Geriatr Pharmacother.* 2010 Aug;8(4):293.
13. Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey AI, Chin LS, Li L. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem.* 2006

14. Chung KK, Dawson VL, Dawson TM. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2001 Nov;24(11 Suppl):S7-14.
15. Cipriani S, Chen X, Schwarzschild MA. Urate: a novel biomarker of Parkinson's disease risk, diagnosis and prognosis. *Biomark Med.* 2010 Oct;4(5):701-12.
16. Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annual Review of Biochemistry* 2005; 74:29-52.
17. Cullen V, Sardi SP, Ng J, Xu YH, Sun Y, Tomlinson JJ, Kolodziej P, Kahn I, Saftig P, Woulfe J, Rochet JC, Glicksman MA, Cheng SH, Grabowski GA, Shihabuddin LS, Schlossmacher MG. Acid  $\beta$ -glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter  $\alpha$ -synuclein processing. *Ann Neurol.* 2011 Jun;69(6):940-53. doi: 10.1002/ana.22400.
18. Davis JW, Grandinetti A, Waslien CI, Ross GW, White LR, Morens DM. Observations on serum uric acid levels and the risk of idiopathic Parkinson's disease. *Am J Epidemiol.* 1996 Sep 1;144(5):480-4.
19. De Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2005 Nov;58(5):797-800.
20. De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology*, 2006; 5: 525:535.
21. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 2004 May;43(3):200-227
22. Dufek M, Hamanová M, Lokaj J, Goldemund D, Rektorová I, Michálková Z, Sheardová K, Rektor I. Serum inflammatory biomarkers in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009 May;15(4):318-20.
23. Durán R, Barrero FJ, Morales B, Luna JD, Ramirez M, Vives F. Oxidative stress and aminopeptidases in Parkinson's disease patients with and without treatment. *Neurodegener Dis.* 2011;8(3):109-16.
24. Durán R, Barrero FJ, Morales B, Luna JD, Ramírez M, Vives F. Plasma  $\alpha$ -synuclein in patients with Parkinson's disease with and without treatment. *Movement Disorders*, 2010; 25:489-493.
25. Duran R, Mencacci NE, Angeli AV, Shoai M, Deas E, Houlden H, Mehta A, Hughes D, Cox TM, Deegan P, Schapira AH, Lees AJ, Limousin P, Jarman PR, Bhatia KP, Wood NW, Hardy J, Foltynie T. The glucocerebrosidase E326K variant predisposes to Parkinson's disease, but does not cause Gaucher's disease. *Mov Disord.* 2012 Dec 5. doi: 10.1002/mds.25248.
26. Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, Beecham GW, Wang L, Züchner S, Konidari I, Wang G, Singer C, Nahab F, Scott B, Stajich JM, Pericak-Vance M, Haines J, Vance JM, Martin ER. Genome-wide

- association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet.* 2010 Mar;74(2):97-109. Epub 2010 Jan 8.
27. El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Court JA, Gibson MJ, Curran MD, Schlossmacher MG, Allsop D. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *The FASEB Journal* 2006; 20:419-425
  28. Foulds P, Mann DM, Allsop D. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein as a potential biomarker for Parkinson's disease and related disorders. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012 Mar;12(2):115-7.
  29. Gasser T. Genomic and proteomic biomarkers for Parkinson disease. *Neurology*, 2009; Supp. 2: S27-S31.
  30. Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S y otros. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet*, 2005; 365: 415-416.
  31. Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ, O'Neill E, Meitinger T, Kolch W, Prokisch H, Ueffing M. The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet.* 2006 Jan 15;15(2):223-32.
  32. Godau J, Herfurth M, Kattner B, Gasser T, Berg D. Increased serum insulin-like growth factor 1 in early idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010 May;81(5):536-8.
  33. Hardy J. Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron.* 2010 Oct 21;68(2):201-6.
  34. Hashimoto S, Sawada T, Inoue T, Yamamoto K, Iwata M. Cholinergic drug induced sicca syndrome in Parkinson's disease: a case report and a review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg.* 1999 Dec;101(4):268-70.
  35. Hirsch EC, Hunot S, Damier P, Brugg B, Faucheux BA, Michel PP, Ruberg M, Muriel MP, Mouatt-Prigent A, Agid Y. Glial cell participation in the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 1999;80:9-18.
  36. Hong Z, Shi M, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Leverenz JB, Baird G, Montine TJ, Hancock AM, Hwang H, Pan C, Bradner J, Kang UJ, Jensen PH, Zhang J. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain.* 2010 Mar;133(Pt 3):713-26.
  37. Ihara Y, Chuda M, Kuroda S, Hayabara T. Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: relationship to clinical data. *J Neurol Sci.* 1999 Nov 30;170(2):90-5.
  38. Ilic TV, Jovanovic M, Jovicic A, Tomovic M. Oxidative stress indicators are elevated in de novo Parkinson's disease patients. *Funct Neurol.* 1999 Jul-Sep; 14(3):141-7.

39. Klein C, Schneider SA, Lang AE. Hereditary parkinsonism: Parkinson disease look-alikes--an algorithm for clinicians to "PARK" genes and beyond. *Mov Disord.* 2009 Oct 30;24(14):2042-58.
40. Kushleika J, Checkoway H, Woods JS, Moon JD, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD. Selegiline and lymphocyte superoxide dismutase activities in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1996 Mar;39(3):378-81.
41. Li QX, Mok SS, Laughton KM, McLean CA, Cappai R, Masters CL, Culvenor JG, Horne MK. Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2007 Apr;204(2):583-8.
42. Lu Z, Jiang H, Xu H, Song N, Xie J. Increased iron levels correlate with the selective nigral dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2011; 118: 361-369.
43. Marttila RJ, Rinne UK. Parkinson's disease and essential tremor in families of patients with early-onset Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988 Mar;51(3):429-31
44. McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol.* 1988 Oct;24(4):574-6.
45. Mecocci, A. Cherubini, M.C. Polidori, R. Cecchetti, F. Chionne, U. Seni. Oxidative stress and lymphocytes in Alzheimer disease Original Research Article Archives of Gerontology and Geriatrics, Volume 26, Supplement 1, 1998, Pages 313-316
46. Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Döring F, Trenkwalder C, Schlossmacher MG.  $\alpha$ -Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet Neurol.* 2011 Mar;10(3):230-40.
47. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* 2005; 28: 57-87.
48. Morgan JC, Mehta SH, Sethi KD. Biomarkers in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010 Nov;10(6):423-30.
49. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Yamaguchi H, Sakumi K. Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 2007 Apr;85(5):919-34.
50. Nakagawa-Hattori Y, Yoshino H, Kondo T, Mizuno Y, Herai S. Is Parkinson's disease a mitochondrial disorder? *Journal of the Neurological Sciences* 1992;107:29-33.
51. Nakai M, Fujita M, Waragai M, Sugama S, Wei J, Akatsu H, Ohtaka-Maruyama C, Okado H, Hashimoto M. Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 22;358(1):104-10.
52. Niklasson F, Agren H. Brain energy metabolism and blood-brain barrier

- permeability in depressive patients: analyses of creatine, creatinine, urate, and albumin in CSF and blood. *Biol Psychiatry*. 1984 Aug;19(8):1183-206.
53. Nuytemans K, Meeus B, Crosiers D, Brouwers N, Goossens D, Engelborghs S, Pals P, Pickut B, Van den Broeck M, Corsmit E, Cras P, De Deyn PP, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, Theuns J. Relative contribution of simple mutations vs. copy number variations in five Parkinson disease genes in the Belgian population. *Hum Mutat*. 2009 Jul;30(7):1054-61.
54. Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65: 1272-1284.
55. Paglini G, Peris L, Mascotti F, Quiroga S, Caceres A. Tau protein function in axonal formation. *Neurochem Res*. 2000 Jan;25(1):37-42.
56. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Dilorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*. 1996 Nov 15;274(5290):1197-9.
57. Reynolds AD, Banerjee R, Liu J, Gendelman HE, Mosley RL. Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J Leukoc Biol*. 2007 Nov;82(5):1083-94.
58. Ridet JL, Bensadoun JC, Déglon N, Aebischer P, Zurn AD. Lentivirus mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2006 Jan;21(1):29-34.
59. Sato Y, Honda Y, Asoh T, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Cardiac involvement in malignant syndrome in Parkinson's disease. *Eur Neurol*. 2005;54(2):88-92.
60. Schapira A. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 2006;66:S10-S23.
61. Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1990; 54: 823-827.
62. Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 1999 Dec;5(4):139-43.
63. Scherzer CR, Grass JA, Liao Z, Pepivani I, Zheng B, Eklund AC, Ney PA, Ng J, McGoldrick M, Mollenhauer B, Bresnick EH, Schlossmacher MG. GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 5;105(31):10907-12.
64. Sharma A, Eberwine J. RNA analysis in neuronal dendrites: insights into Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*. 2008 Dec;8(12):1775-7.
65. Shi M, Zhang J. CSF  $\alpha$ -synuclein, tau, and amyloid  $\beta$  in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2011 Aug;10(8):681; author's reply 681-3.
66. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:193-222.



67. Sudha K, Rao AV, Rao S, Rao A. Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease. *Neurol India*. 2003 Mar;51(1):60-2.
68. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*. 2010 Mar;37(3):510-8.
69. Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, Locascio JJ, Schlossmacher MG, El-Agnaf OM. Decreased alphasynuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Oct 13;349(1):162-6.
70. Vijitruth R, Liu M, Choi DY, Nguyen XV, Hunter RL, Bing G. Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2006 Mar 27;3:6.
71. Waragai M, Sekiyama K, Sekigawa A, Takamatsu Y, Fujita M, Hashimoto M.  $\alpha$ -Synuclein and DJ-1 as Potential Biological Fluid Biomarkers for Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2010 Oct 29;11(11):4257-66.
72. Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the etiology of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology* 2007;150:963-976.
73. Younes-Mhenni S, Frih-Ayed M, Kerkeni A, Bost M, Chazot G. Peripheral blood markers of oxidative stress in Parkinson's disease. *Eur Neurol*. 2007;58(2):78-83.
74. Zabetian CP, Hutter CM, Factor SA, Nutt JG, Higgins DS, Griffith A, Roberts JW, Leis BC, Kay DM, Yearout D, Montimurro JS, Edwards KL, Samii A, Payami H. Association analysis of MAPT H1 haplotype and subhaplotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2007 Aug;62(2):137-44.
75. Zhang Z, Li X, Xie W, Tuo H, Hintermann S, Jankovic J, Le W. Anti-Parkinsonian Effects of Nurr1 Activator in Ubiquitin-Proteasome System Impairment Induced Animal Model of Parkinson's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012 Apr 4.
76. (PPMI). Parkinson Progression Marker Initiative. The Parkinson Progression Marker Initiative. *Prog Neurobiol*. 2011 Dec;95(4):629-35. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.09.005.

## Capítulo 5

# **Efectos del estrés físico y medioambiental sobre los niveles de mRNA y proteínas de los isoenzimas de la 5alfa-reductasa tipo 1 y tipo 2 en corteza prefrontal de rata**

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



# Efectos del estrés físico y medioambiental sobre los niveles de mRNA y proteínas de los isoenzimas de la Salfa-reductasa tipo 1 y tipo 2 en corteza prefrontal de rata

Pilar Sánchez<sup>1</sup>, Jesús M. Torres <sup>1,2</sup>, Beatriz Castro <sup>1</sup>, Esperanza Ortega <sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España.

<sup>2</sup> Instituto de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España.

Correspondencia: Dpto de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España. Avda. de Madrid s/n, 18012 Granada, Spain. Tel.: (+34)-958-243519. Fax: (+34)-958-249015. E-mail: esortega@ugr.es

*Las situaciones de estrés físico, psíquico o ambiental, cada vez más frecuentes en el mundo actual, son causa de diversos desórdenes psicológicos e incluso la muerte. Se ha demostrado la asociación que existe entre el estrés y cambios en las concentraciones de neuroesteroides 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -reducidos. La 5 $\alpha$ -reductasa (5 $\alpha$ -R) es la enzima limitante en la biosíntesis de neuroesteroides 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -reducidos. En este estudio se ha cuantificado los niveles de mRNA y proteínas de los isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de ratas macho estresadas por natación forzada y de ratas macho y hembra estresadas medioambientalmente. Nuestros resultados demuestran un incremento significativo en los niveles de mRNA y proteína de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal, de ratas macho sometidas a estrés físico por natación forzada con respecto a sus controles. Los niveles de mRNA y proteína de 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de ratas macho sometidas a estrés medioambiental, fueron significativamente superiores con respecto a sus controles. Además, se observa un dimorfismo sexual en los niveles de mRNA y proteína de 5 $\alpha$ -R1 en corteza prefrontal de ratas estresadas medioambientalmente, con un incremento en ratas macho y una disminución en ratas hembra. Se ha sugerido que los neuroesteroides pueden estar implicados en cambios en la identidad sexual y en el comportamiento maternal de la rata. El dimorfismo sexual de 5 $\alpha$ -R1 podría explicar al menos en parte estos fenómenos a nivel molecular.*

---

## **Introducción**

El estrés es una reacción fisiológica del organismo en el que entran en juego diversos mecanismos de defensa para afrontar una situación que se percibe como amenazante. Es un hecho conocido que las situaciones de estrés,

tanto agudas como crónicas, alteran la homeostasis del individuo humano y animal, produciendo diversos estados patológicos [1,2].

Los neuroesteroides, término acuñado por primera vez por Baulieu y col [3], son esteroides sintetizados "in situ" en el SNC que participan en el estado psicológico del individuo humano, ya que tienen efectos anestésicos, anticonvulsivos y analgésicos similares a algunas drogas sedativas e hipnóticas, incluidas las benzodiazepinas.

En 1991 por primera vez observaron una asociación entre el estrés físico agudo y cambios en las concentraciones de neuroesteroides [4], demostrando que el estrés físico, por natación forzada, induce un incremento en los niveles de progesterona y su metabolito  $3\alpha,5\alpha$ -reducido (allopregnanolona) en plasma y cerebro de rata [5-7]. Desde entonces, numerosos autores han encontrado en roedores, modificaciones en plasma y cerebro de los niveles de neuroesteroides bajo diferentes situaciones de estrés [5,6], diferenciando entre los efectos del estrés agudo y crónico [7,8]. Además, se ha demostrado que las situaciones de estrés modifican en rata los niveles de ambos neuroesteroides  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos, es decir, allopregnanolona [3] y tetrahydrodesoxicorticosterona (THDOC) [7]. Igualmente, estudios en humanos han mostrado que situaciones de estrés agudo (p. ej. intoxicación por ingesta de alcohol) incrementan los niveles plasmáticos de allopregnanolona en adolescentes [8,9].

Los neuroesteroides  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos son sintetizados a partir de progesterona y deoxycorticosterona (DOC) por las enzimas esteroideogénicas  $5\alpha$ -Reductasa ( $5\alpha$ -R) y  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\alpha$ -HSD), siendo la última la enzima limitante de la reacción. La enzima  $5\alpha$ -R es expresada como tres isoenzimas,  $5\alpha$ -R1,  $5\alpha$ -R2 y  $5\alpha$ -R3, siendo  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 bien conocidas en el cerebro [10,11]. Ambas isoenzimas están presentes en varias regiones del cerebro, incluyendo la corteza cerebral [12-16]. La transmisión GABAérgica juega un papel central controlando el estado emocional del individuo y regulando la reactividad a rápidos cambios ambientales que pueden llevar a la ansiedad [7]. Así, situaciones de estrés, a través de modificaciones del receptor tipo A del ácido gamma amino butírico (GABAA-R) pueden intervenir en estos

acontecimientos [17-21]. Las benzodiazepinas y sus congéneres, que actúan como moduladores alostéricos del complejo GABAA-R, quitan la ansiedad en humanos y pueden participar en la respuesta endógena al estrés [22]. Los neuroesteroides 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -reducidos modulan alostéricamente el GABAA-R de igual manera que las benzodiazepinas [23-26] y por tanto, pueden jugar igual papel que dichos fármacos en esta respuesta. Sí los niveles de neuroesteroides 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -reducidos en el cerebro se modifican tras las situaciones de estrés [5,6] es lógico hipotetizar que los niveles de los isoenzimas 5 $\alpha$ -R1, 5 $\alpha$ -R2 o ambos, puedan modificarse en situaciones de estrés físico o medioambiental.

El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles de expresión y mRNA de los isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en la corteza prefrontal de rata macho y hembra en condiciones de estrés físico por natación forzada y estrés medioambiental emulando las situaciones de estrés laboral (exceso de calor, luz artificial, y sensación de inmovilidad) [27].

## **Materiales y métodos**

### **Animales**

Ratas adultas macho y hembra Wistar de peso 260-280 g y 180-200 g, respectivamente, fueron mantenidas en el animalario con aire acondicionado e iluminación desde las 7:00 horas hasta 19:00 horas y fueron alimentadas con dieta estándar de mantenimiento A04 (Panlab) y agua ad lib. Los experimentos fueron realizados acorde a la guía NIH para el “Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio”.

### **Ratas sometidas a estrés físico**

Las ratas macho adultas fueron sometidas a estrés físico por natación forzada durante 5 minutos, en agua a temperatura ambiente (22°C), dentro de un contenedor cilíndrico lleno al 75% de su capacidad, siguiendo el protocolo de Purdy y col., [4]. Transcurridos los 5 minutos, las ratas fueron retiradas del contenedor, secándolas suavemente con una toalla y metiéndolas en jaulas.

## **Ratas sometidas a estrés medioambiental**

Ratas macho y hembra adultas fueron sometidas a estrés medioambiental. Dicho estrés consistía en introducir al animal en un aparato de estrés que presenta tres fuentes estresantes: luz 2500 luxes, calor 32°C, e inmovilización, siguiendo el protocolo de Perez-Laso y col., [28] y Rodríguez Martín y col., [29]. La duración de las sesiones de estrés fueron 45 minutos, tres veces al día a las 9h, 13h, y 17h, durante 10 días.

A los 15 minutos después de la última sesión de estrés físico y medioambiental las ratas fueron eutanizadas por decapitación para evitar los efectos adversos de la anestesia. Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos que contenían heparina y fueron centrifugadas a 800 g durante 15 minutos. El plasma fue separado y guardado a -80°C. Inmediatamente después de la decapitación, el cerebro fue extraído, congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80°C hasta el análisis. La disección del área de la corteza prefrontal se realizó tomando como referencia el Atlas estereotáxico de cerebro de rata Paxino y Watson [30]. Una vez extraído el cerebro se divide los dos hemisferios con un corte sagital y a su vez, de cada hemisferio se hacen dos cortes coronales delimitados por los planos coronales entre 3.7 mm -2.2 mm anteriores a bregma del Atlas. Posteriormente, de cada lámina se separa un rectángulo que delimita las áreas; corteza singular anterior, prelímbica e infralímbica.

## **Análisis hormonal**

Las concentraciones plasmáticas de ACTH se realizaron por radioinmunoensayo (RIA), utilizando un kit inmunoradiométrico (CIS Biointernational, Gif-Ur Yvette Cedex, France). Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron 4.4% y 3.4%, respectivamente.

Las concentraciones plasmáticas de corticosterona se realizaron por RIA, utilizando un kit de ICN (Biomedical Inc Costa Mesa California). Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron 4.4% y 3.4%, respectivamente.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y en el mismo ensayo.

### **Oligonucleótidos usados para las amplificaciones**

Las secuencias de nucleótidos correspondientes para las isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 de rata fueron obtenidas del GeneBank® (J05035, M95058) y la secuencia plasmídica pEGFP-C1 se obtuvo de la página web Clontech. Esas secuencias eran usadas para diseñar los pares de primers. Todos los primers forward estaban marcados con 6-carboxi-fluoresceína (6-FAM), en posición 5'. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por PE\_Applied Biosystems (Warrington, UK). Las secuencias de los primers (5'-3') y el tamaño de los productos de PCR fueron como previamente se describió [31].

### **Construcción del estándar interno**

Dos moléculas competitivas de 300 pb fueron sintetizadas como estándar interno (IS-1 IS-2) de acuerdo a Torres and Ortega [31].

### **Reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa**

El RNA total fue extraído a partir de 25 mg de corteza prefrontal de rata mediante Tiocionato de Guanidina-Fenol-Cloroformo [32]. El RNA fue resuspendido en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) y fue cuantificado espectrofotométricamente. La reverso transcripción fue llevada a cabo de acuerdo a Torres y Ortega [31]. El programa de PCR fue: desnaturalización a 94°C durante 30 seg.; anillamiento 44°C durante 30 seg.; y extensión 72°C durante 30 seg. El número de ciclos fue 35 en todos los casos. La PCR fue llevada a cabo en un Pekín-Elmer 2400 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, California, USA).

La cantidad de mRNA fue expresado como el número de moléculas de mRNA por  $\mu$ g del RNA total. Después de ser generado el cDNA a partir del RNA total mediante la reacción de retrotranscripción RT, se co-amplifica en presencia de cantidades decrecientes del DNA competidor ( $64 \times 10^6$  a  $0.5 \times 10^6$  moléculas). Co-amplificamos el cDNA correspondiente a 5 $\alpha$ -R1 y el DNA competidor IS-1 utilizando el mismo par de primers. Con cantidades decrecientes del estándar



interno (300 p.b.), aumenta la intensidad relativa del producto amplificado de 185 p.b. (DNA problema). De igual modo, co-amplificamos el cDNA correspondiente a 5 $\alpha$ -R2 y el DNA competidor IS-2 utilizando el mismo par de primers. Con cantidades decrecientes del estándar interno (300 p.b.), aumenta la intensidad relativa del producto amplificado de 192 p.b. (DNA problema).

### **Análisis de los productos de PCR**

Un sistema de electroforesis capilar inducida por láser (LIF-CE ABIPRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystem) fue utilizado para caracterizar los productos de RT-PCR. Las condiciones de electroforesis capilar fueron llevadas a cabo de acuerdo a Torres y Ortega [31]. Los ratios de fluorescencia de 5 $\alpha$ -R/IS fueron determinados a través de la cantidad apropiada de ADN competitivo, y la concentración de ADN de la muestra problema fue calculada de acuerdo a Torres y Ortega [31].

### **Análisis inmunohistoquímico**

En ratas macho sometidas a estrés físico por natación se determinó su expresión microsomal de las isoenzimas 5 $\alpha$ -R por inmunohistoquímica. La corteza prefrontal fue fijada con formol al 10% e incluida en parafina siguiendo el proceso estándar. Los anticuerpos para 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 (sc-20399 y sc 20659, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) fueron optimizados en el hígado y próstata (órganos que expresan principalmente 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2, respectivamente) como control positivo. Los anticuerpos primarios fueron diluidos a 1:50 (5 $\alpha$ -R1) y 1:25 (5 $\alpha$ -R2). El sistema de detección fue basado en la tecnología polímero-peroxidasas seguido por el desarrollo con 3,3'-diaminobenzidina/peróxido de hidrógeno (Máster Diagnóstica S.L., Granada, Spain). Posteriormente, fue la contraindicación con hematoxilina, las secciones fueron deshidratadas, aclaradas y montadas. Los resultados fueron expresados como el número de células positivas por mm<sup>2</sup>. Fue usado un método de escala semicuantitativa (0-3 escala) para evaluar la intensidad de inmunotinción de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2.

## **Análisis Western blot**

En ratas macho y hembra sometidas a estrés medioambiental se determinó su expresión microsomal de las isoenzimas 5 $\alpha$ -R por Western blot. La corteza prefrontal fue homogenizada en solución de sucrosa 250mM conteniendo 0.5 mM DTT y 0.5 mM EDTA, pH 6.8. Los microsomas fueron obtenidos por centrifugación diferencial (1000 xg, 10 min; 22.000 x g, 10 min; 105.000 x g, 60 min). La proteínas citosólicas adheridas fueron eliminadas, el pellet fue lavado a pH 8.0 en 150 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT, y 0.5 mM EDTA. Los microsomas fueron solubilizados por sonicación de acuerdo a Cristóbal y col., [33]. Todos los pasos fueron llevados a cabo a 4°C. La cuantificación de las proteínas fue realizada con el método de Bradford [34].

Las muestras de proteínas con similar concentración fueron cargadas en un gel al 12% SDS-PAGE. Después de la electroforesis las proteínas fueron transferidas desde el gel hacia la membrana de nitrocelulosa en un tampón que contiene 25 mM Tris, 190 mM glicina y 20% metanol. La membrana fue bloqueada con una solución de leche en polvo no grasa al 5% y con detergente Tween 20 al 0.1% en solución salina amortiguadora fosfatada (T-PBS). Posteriormente, la membrana fue incubada, con anticuerpo primario diluido al 1:1000 en T-PBS conteniendo el 0.5% de leche durante toda la noche a 4°C. Después de varios lavados con T-PBS la membrana fue incubada con anticuerpo secundario antigoat o antirabbit IG horseradish peroxidase, diluido a 1:5000. A continuación, se realizaron varios lavados con T-PBS. Las proteínas fueron visualizadas con el sistema de detección de quimioluminiscencia (Amersham). Los anticuerpos usados para 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA). El anticuerpo para beta-tubulina (Abcam, Cambridge, UK) fue usado como control.

## **Análisis estadístico**

Los resultados fueron llevados a cabo usando un test de Student's. Los datos fueron expresados como media $\pm$ S.E.M. Se utilizó el software SPSS 15.0 para Windows.

## Resultados

### Niveles plasmáticos de hormona

Fig. 1 representa los niveles plasmáticos de ACTH (Fig. 1A) y corticosterona (Fig. 1B) en ratas macho control y estresada por natación forzada. Los niveles de ACTH y corticosterona aumentaron significativamente tras el estrés físico, en comparación con sus respectivos controles.

Fig. 2 representa los niveles plasmáticos de ACTH (Fig. 2A) y corticosterona (Fig. 2B) en ratas macho y hembra control y estresada medioambientalmente. Los niveles de ACTH y corticosterona en rata macho y hembra aumentaron significativamente tras el estrés medioambiental, en comparación con sus respectivos controles.

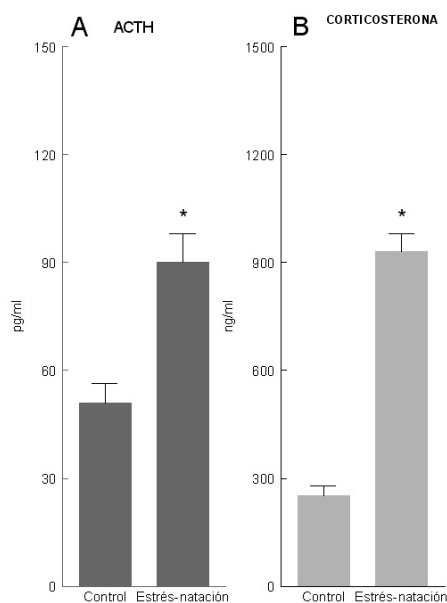
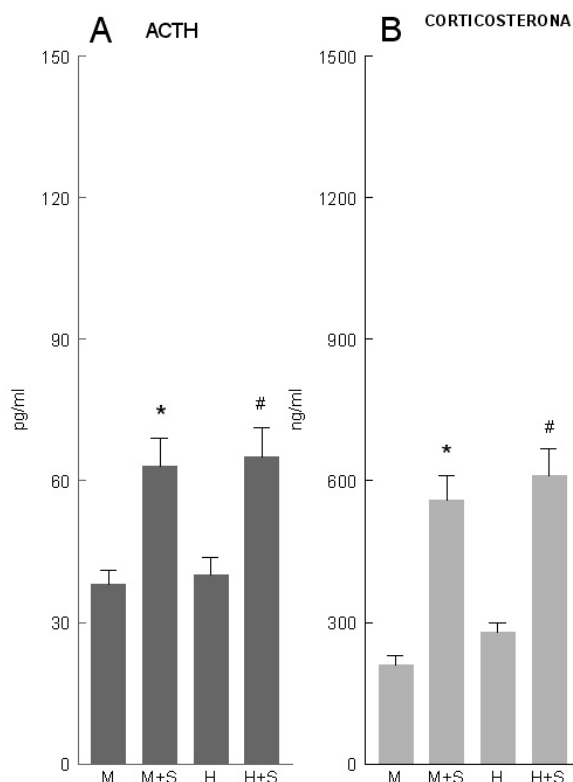


Figura 1

**Fig. 1 Niveles plasmáticos de ACTH (A) y corticosterona (B) en ratas macho control y sometidas a estrés físico por natación forzada. \*p 0.01 vs animales control**

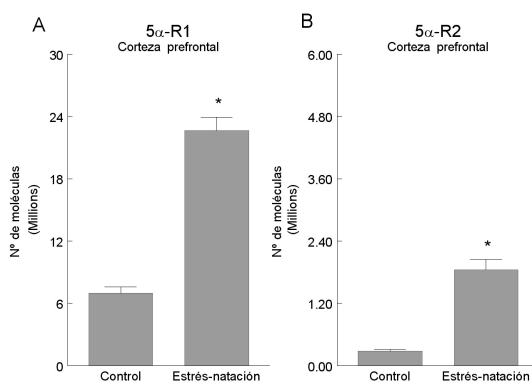


**Fig. 2 Niveles plasmáticos de ACTH (A) y corticosterona (B) en ratas macho y hembra control y sometidas a estrés medioambiental. M (macho control); M + S (macho estresado medioambientalmente); F (hembra control); F +S (hembra estresada medioambientalmente); \*p 0.01 vs machos control, #p 0.01 vs hembra control**

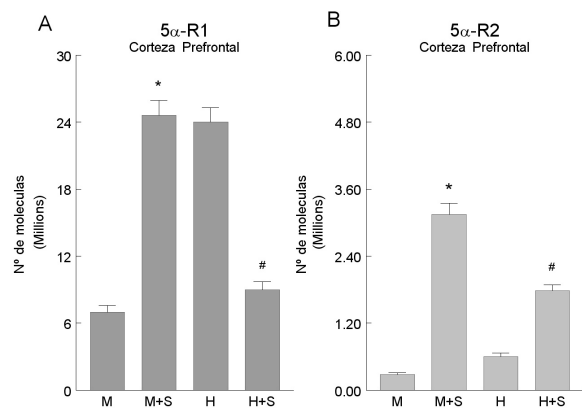
## Cuantificación de los niveles de mRNA de la 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal

Fig. 3 representa los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 (Fig. 3A) y 5 $\alpha$ -R2 (Fig. 3B) en corteza prefrontal de ratas macho sometidas a estrés físico por natación forzada. Los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 aumentaron significativamente tras el estrés físico, en comparación con sus respectivos controles.

Fig. 4 representa los niveles de de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 (Fig. 4A) y 5 $\alpha$ -R2 (Fig. 4B) en corteza prefrontal de ratas macho y hembra sometidas a estrés medioambiental. Los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 fueron significativamente mayores en hembras que en machos. Los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 aumentaron significativamente tras el estrés mediambiental en machos y disminuyeron significativamente en hembras, en comparación con sus respectivos controles. Los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R2 fueron significativamente mayores en hembras que en machos. Los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R2 aumentaron significativamente tras el estrés medioambiental en ratas macho y hembra, en comparación con sus respectivos controles.



**Fig. 3 Efectos del estrés físico por natación forzada sobre los niveles de mRNA de la isoenzimas 5 -reductase tipo 1 (5 -R1) (A) y 5 -reductase tipo 2 (5 -R2) (B) en corteza prefrontal de ratas macho control y tras el estrés agudo por natación. \*p 0.01 vs animales control**

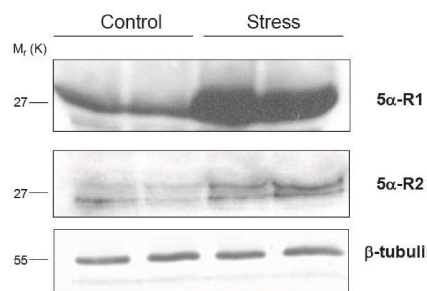


**Fig. 4 Efectos del estrés medioambiental sobre los niveles de mRNA de la isoenzimas 5 -reductase tipo 1 (5 -R1) (A) y 5 -reductase tipo 2 (5 -R2) (B) en corteza prefrontal de ratas macho y hembra control y tras el estrés medioambiental. M (macho control); M + S (macho estresado medioambientalmente); F (hembra control); F + S (hembra estresada medioambientalmente); \*p 0.01 vs machos control, #p 0.01 vs hembra control**

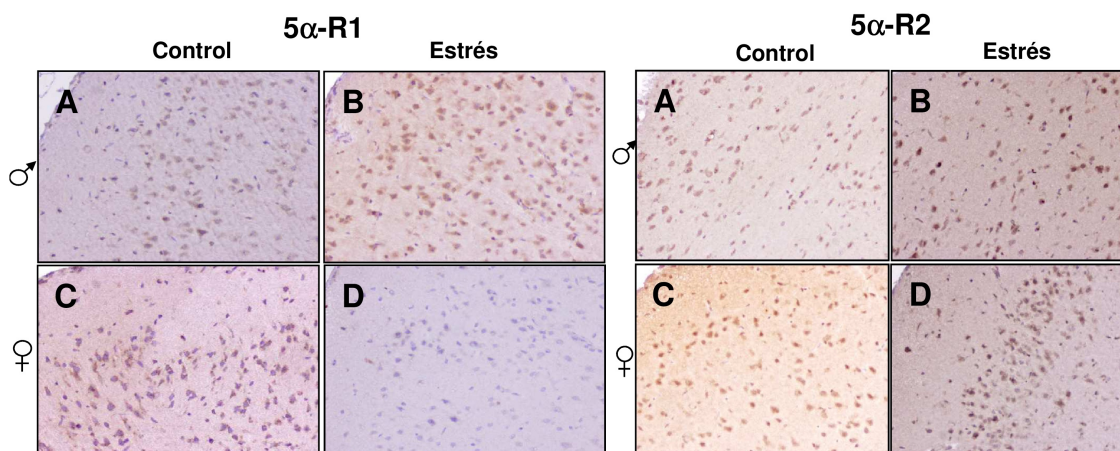
## Determinación de los niveles de proteína de la 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal

La Fig. 5 representa mediante Western blot la cantidad de proteína relativa de las isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de ratas macho sometidas a estrés físico por natación forzada. Los niveles de expresión de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 aumentaron significativamente tras el estrés físico, en comparación con sus respectivos controles. En el Western blot aparecen dos bandas para 5 $\alpha$ -R2, esta doble banda puede deberse a la ruptura proteolítica del antígeno.

La Fig. 6 representa mediante inmunohistoquímica la cantidad de proteína relativa de la isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en corteza prefrontal de ratas macho y hembra sometidas a estrés medioambiental. Un sistemático mapeo celular para las isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 indica que se expresan en las



**Fig. 5** Efectos del estrés físico por natación forzada sobre los niveles proteicos de la isoenzimas 5 -reductase tipo 1 (5 -R1) y 5 -reductase tipo 2 (5 -R2) en corteza prefrontal de ratas macho control y tras el estrés agudo por natación mediante Western blot. Las muestras (50  $\mu$ g/banda) a partir de la fracción microsomal fueron cargadas en un gel SDS\_PAGE al 12% y los gels fueron procesados por Western blot usando anticuerpos policlonales para la 5 -R. La -tubulina fue utilizada como control de cantidad de proteína. Todas las muestras fueron corridas en duplicado



**Fig. 6** Efectos del estrés físico medioambiental sobre los niveles proteicos de la isoenzimas 5 -reductase tipo 1 (5 -R1) y 5 -reductase tipo 2 (5 -R2) en corteza prefrontal de ratas macho y hembra control y tras el estrés medioambiental mediante inmunohistoquímica. Muestras representativas de ratas macho y hembra control para 5 -R1 y 5 -R2 (A, C) y estresadas medioambientalmente (B, D). Aumento x 200.

neuronas pero no en las células gliales, de acuerdo con Agís Balboa y col., [12]. En el análisis inmunohistoquímico se observó para 5 $\alpha$ -R1 una mayor tinción en ratas macho sometidas a estrés medioambiental (panel B), en comparación con sus respectivos controles (panel A) y una débil expresión en ratas hembra sometidas a estrés medioambiental (panel D), en comparación con sus respectivos controles (panel C). En el análisis inmunohistoquímico se observó para 5 $\alpha$ -R2 una mayor tinción en ratas macho y hembra sometidas a estrés medioambiental (paneles B y D), en comparación con sus respectivos controles (paneles A y C). En la figura se representa una muestra representativa de los respectivos grupos. El número de células positivas por mm<sup>2</sup> de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 y el método semicuantitativo usado para evaluar la intensidad de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 son mostradas en la tabla 1.

**Tabla 1. Cuantificación inmunohistoquímica de las isoenzimas 5 -Reductasa type 1 (5 -R1) y 5 -Reductasa type 2 (5 -R2) en corteza prefrontal. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SE.**

(\* p<0.05 vs. control, # p<0.001 vs. control). (Valores inmunohistoquímicos: 0-3+).

		5 $\alpha$ -R1	5 $\alpha$ -R2
Macho	Control	517.86 $\pm$ 50.12 (1+)	265.25 $\pm$ 50.3 (1+)
	Estrés	689.15 $\pm$ 63.10* (2+)	491.20 $\pm$ 92.04* (2+)
Hembra	Control	601.17 $\pm$ 50.18 (1+)	299.10 $\pm$ 50.03 (1+)
	Estrés	219.94 $\pm$ 76.58# (1+/-)	482.12 $\pm$ 71.10*(1+/2+)

## **Discusión**

Las condiciones de estrés medioambiental son factores importantes en la salud humana y podrían ser consideradas en el desarrollo de políticas sanitarias apropiadas, ya que se han asociado con importantes trastornos psicosociales e incluso con la muerte [27,35,36].

Una relación ha sido demostrada entre el estrés físico y cambios en las concentraciones de neuroesteroides 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -reducidos en rata [4]. Además,

también ha sido demostrada una correlación entre el estrés y desórdenes psicológicos [8,37]. Por lo tanto, la determinación de neuroesteroides  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos bajo situaciones de estrés físico y mediambiental, no sólo nos permitiría entender el papel de los neuroesteroides en situaciones de estrés, sino también desarrollar nuevos agentes terapéuticos para los desórdenes psicóticos o mentales [38]. En este contexto, bajos niveles de tetrahydrocortisol (neuroesteroide  $3\alpha,5\alpha$ -reducido) y baja actividad del enzima  $5\alpha$ -R (enzima limitante en la biosíntesis de neuroesteroide  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos), ha sido asociada con la falta de respuesta a los tratamientos psicológicos en enfermedades de estrés postraumático [39]. Por lo tanto, una situación de estrés físico o mediambiental podría modificar  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2, o ambas isoenzimas. Esta cuestión podría ser importante para el diseño de fármacos selectivos.

Nuestros resultados demuestran que en situaciones de estrés físico por natación forzada, se produce un incremento en los niveles de mRNA y proteína de ambas isoenzimas  $5\alpha$ -R en la corteza prefrontal de rata macho.

El aumento de allopregnanolona en el cerebro de rata tras el estrés físico por natación forzada previamente observado por Purdy y col., [4], podría ser producido por el incremento en los niveles de progesterona plasmática tras el estrés [4], dicha progesterona podría cruzar la barrera hematoencefálica y ser sustrato de la isoenzimas  $5\alpha$ -R en la corteza cerebral, y también debido al aumento en los niveles de las isoenzimas  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2.

$5\alpha$ -R1 fue considerada previamente como una enzima constitutiva que protege a las neuronas de la apoptosis inducida por el exceso de glucocorticoides [40,41]. Sin embargo, nuestro grupo de investigación demostró previamente que dicha isoenzima no es constitutiva, ya que está regulada negativamente por testosterona y dihidrotestosterona y podría tener otra función además de catabólica, por ejemplo, la biosíntesis de neuroesteroides  $3\alpha,5\alpha$ -reducido [15].  $5\alpha$ -R2 es considerada una enzima androgénica [15,41,42], que en condiciones fisiológicas puede producir dihidrotestosterona en rata macho y por lo tanto, podría establecer y mantener el dimorfismo sexual de algunas regiones del cerebro [15,16].

Nuestros resultados demuestran que en la corteza prefrontal de rata macho, los genes 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 están controlados positivamente por un factor o factores inducidos por el estrés físico.

Las ratas macho y hembra muestran diferentes niveles de ansiedad [43] y neuroesteroides 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -reducido [44]. Existen diferencias entre roedores macho y hembra sobre la actividad de 5 $\alpha$ -R en el hígado, y en los niveles de mRNA y proteínas de 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en diferentes tejidos [15,16,45]. La respuesta de ambas isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 a una situación de estrés medioambiental podría, por lo tanto, diferir entre machos y hembras.

Nuestros resultados demuestran, a nuestro conocimiento por primera vez, que condiciones de estrés medioambiental (exceso de calor, luz artificial, y sensación de inmovilidad), situaciones similares en la vida laboral de algunos individuos [27], produce un incremento en los niveles de mRNA y proteínas de ambas isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 en la corteza prefrontal de ratas macho. EL incremento de ambas isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2 y el aumento de progesterona tras el estrés (para la cual las isoenzimas 5 $\alpha$ -R tienen mayor afinidad) [46] podría conllevar a un incremento en la biosíntesis de neuroesteroides 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -reducido en el cerebro, tal y como se ha demostrado en otros tipos de estrés [7]. Nuestros resultados están en línea con estudios previos, que muestran el significado decremento en los niveles de ansiedad de ratas macho adultas que habían sido expuestas a estrés durante el periodo prenatal [43].

En la rata hembra, el estrés medioambiental produjo diferentes efectos en los niveles de mRNA de las isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2. La transcripción del gen 5 $\alpha$ -R2 aumentó tras ser sometida la rata a estrés medioambiental, presentando un comportamiento similar al encontrado en la rata macho. Sorprendentemente, sin embargo, los efectos del estrés medioambiental sobre los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -R1 fueron sexualmente dimórficos (opuestos en hembra vs. machos). Este hecho probablemente se deba al estatus de hormonas gonadales durante la diferenciación sexual del SNC [13]. La rata hembra en condiciones fisiológicas, presenta altos niveles de niveles de mRNA y proteínas de ambas isoenzimas 5 $\alpha$ -R1 y 5 $\alpha$ -R2, así como de progesterona. Ello podría ser la explicación de que los



niveles de allopregnanolona en el cerebro de rata sean superiores en hembra que en macho [13,15,16]. Esos datos son consistentes con estudios previos que demuestran que los niveles de ansiedad en ratas macho adulta son significativamente superiores a los de rata hembra de edad reproductiva [43]. Por lo tanto, los niveles de neuroesteroides  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos podrían ser menores entre las ratas macho y hembra estresadas. Aunque en la rata hembra tras el estrés presenta un aumento en los niveles de  $5\alpha$ -R2, el descenso en los niveles de  $5\alpha$ -R1 es mucho mayor. Una posible explicación al descenso en los niveles de  $5\alpha$ -R1 encontrado en rata hembra estresada, podría ser un mecanismo de defensa para evitar la sobreexpresión del gen  $5\alpha$ -R1, ya que dicho gen se encuentra muy sobreexpresado en rata hembra en condiciones fisiológicas. Diversos autores demostraron en este sentido que la activación de los receptores GABAA inhiben la actividad de las enzimas  $5\alpha$ -R y  $3\alpha$ -HSD. Los neuroesteroides THP y THDOC, que son potentes moduladores alostéricos del GABAA-R, regulan su biosíntesis por un mecanismo de feed-back. De acuerdo con nuestros resultados, los neuroesteroides  $3\alpha,5\alpha$ -reducidos ejercen también un mecanismo de control sobre su propia biosíntesis, regulando la expresión de la  $5\alpha$ -1, al igual que se ha sugerido para el eje hipotámico-hipófisis-adrenal [7].

Tras el estrés medioambiental, los niveles de mRNA y proteína de  $5\alpha$ -R1, la principal isoenzima que contribuye en la biosíntesis de allopregnanolona (un potente esteroide neuroactivo que actúa como modulador alostérico positivo del complejo GABAA-R) muestra un dimorfismo sexual. Estos resultados podrían explicar en parte las diferencias de género en la incidencia de algunos tipos de depresión [47] y desórdenes postraumáticos en humanos [48].

## **Conclusión**

Nuestros resultados demuestran que las situaciones de estrés físico por natación forzada y medioambiental, regulan la transcripción expresión de  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2. Estos datos podrían abrir una nueva línea para el conocimiento de los procesos y enfermedades que acompañan a las situaciones de estrés.

## **Referencias**

1. Moomal H, Jackson PB, Stein DJ, Herman A, Myer L, Seedat S, Madela-Mntla E, Williams DR. Perceived discrimination and mental health disorders: the South African Stress and Health study. *S Afr Med J*, 2009, 99:383-9.
2. Lodge DJ, Grace AA. Developmental pathology, dopamine, stress and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci*, 2011, 29:207-13.
3. Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 1998, 23:963-87.
4. Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM. Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:4553-4557.
5. Biggio G, Concas A, Mostallino MC, Purdy RH, Trabucchi M, Barbaccia ML. Inhibition of GABAergic transmission enhances neurosteroid concentrations in the rat brain. In: A.R. Genazzi, F. Petraglia, R. H. Purdy (Eds), *The Brain: Source and Target for Sex Steroid Hormones*. Parthenon Press, New York, 1996, pp. 43-62.
6. Biggio G, Barbaccia ML, Follesa P, Serra M, Purdy RH, Concas A. Neurosteroids and GABAA receptor plasticity. In: R.W. Olsen, D.L. Martin (Eds), *GABA in the Nervous System*. Lippincott, New York, 2000, pp. 207-232.
7. Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G. Stress and neuroactive steroids. *Int Rev Neurobiol*, 2001, 46:243-272.
8. Torres JM, Ortega E. Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in male adolescent humans. *Psychopharmacology*, 2004, 172:352-355.
9. Torres JM, Ortega E. Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in female adolescent humans. *Neuropsychopharmacology*, 2003, 28:1207-1209.
10. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63:25-61.
11. Uemura M, Tamura K, Chung S, Honma S, Okuyama A, Nakamura Y, Nakagawa H. Novel 5 alpha-steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci*, 2008, 99:81-86.
12. Agís-Balboa RC, Pinna G, Zhubi A, Maloku E, Veldic M, Costa E, Guidotti A. Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:14602-14607.
13. Sánchez P, Torres JM, Del Moral RG, Ortega E. Effects of testosterone on brain mRNA levels of steroid 5alpha-Reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Neurochem Int*, 2006, 49:626-630.

14. Sánchez P, Torres JM, Ortega E. Effects of dihydrotestosterone on brain mRNA levels of steroid 5 $\alpha$ -Reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Neurochem Res*, 2005, 30:577-581.
15. Torres JM, Ortega E. Differential regulation of steroid 5 $\alpha$ -Reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J*, 2003, 17:1428-1433.
16. Torres JM, Ortega E. Steroid 5 $\alpha$ -Reductase isozymes in the adult female rat brain: central role of dihydrotestosterone. *J Mol Endocrinol*, 2006, 36:239-245.
17. Biggio G, Corda MG, Concas A. Rapid changes in GABA binding induced by stress in different areas of the rat brain. *Brain Res*, 1981, 229:363-369.
18. Biggio G, Concas A, Mele S, Corda MG. Changes in GABAergic transmission by zolpidem, an imidazopyridine with preferential affinity for type I benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol*, 1987, 161:173-180.
19. Biggio G. The action of stress,  $\beta$ -carbolines, diazepam and Ro 15-1788 on GABA receptors in the rat brain. In: G. Biggio, E. Costa, (Eds), *Benzodiazepine Recognition Site Ligands: Biochemistry and Pharmacology*. Raven Press, New York, 1983, pp. 105-17.
20. Concas A, Mele S, Biggio G. Foot shock stress decreases chloride efflux from rat brain neurosynaptosomes. *Eur J Pharmacol*, 1987, 135:423-427.
21. Concas A, Corda MG, Biggio G. Involvement of benzodiazepine recognition sites in the foot shock-induced decrease of low affinity GABA receptors in the rat cerebral cortex. *Brain Res*, 1985, 341:50-56.
22. Haefely WE. Allosteric modulation of the GABA<sub>A</sub> receptor channel: A mechanism for interaction with a multitude of central nervous system functions. In: H.C. Mohler, M. Da Prada (Eds), *The Challenge of Neuropharmacology*. Editions Roche, Basel, 1994, 15-39.
23. Majewska MD. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol*, 1992, 38:379-395.
24. Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J*, 1992, 6:2311-2322.
25. Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Rev*, 2001, 37:3-12.
26. Akk G, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther*, 2007, 116:35-57.
27. Woo JM, Postolache TT. The impact of work environment on mood disorders and suicide: Evidence and implications. *Int J Disabil Hum Dev*, 2008, 7:185-200.
28. Pérez-Laso C, Segovia S, Martín JL, Ortega E, Gómez F, Del Cerro MC. Environmental prenatal stress alters sexual dimorphism of maternal

- behavior in rats. *Behav Brain Res*, 2008, 87:284–288.
29. Rodriguez Martin JL, Perez Laso C, Barona M, Ortega E, Guillamon A, Segovia S, Del Cerro MCR. Activation of Fos Like immunoreactivity in the accessory olfactory bulbs following induction of maternal behavior in prenatally stressed rats. 1998. Available at: <http://mcmaster.ca/inabis98/cruzrdelcerro/rodriguez-martin0816/two.html>
  30. Paxinos G, Watson C. (Ed.) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Second Edition, New York, 1986.
  31. Torres JM, Ortega E. Quantitation of mRNA levels of steroid 5alpha-Reductase isozymes: a novel method that combines quantitative RT-PCR and capillary electrophoresis. *Int J Biochem Cell B*, 2004, 36:78-88.
  32. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162:156-159.
  33. Cristobal S, Ochoa B, Fresnedo O. Purification and properties of a cholesteryl ester hydrolase from rat liver microsomes. *J Lipid Res*, 1999, 40:715-725.
  34. Bradford MN. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.
  35. Rainham DG, Smoyer-Tomic KE. The role of air pollution in the relationship between a heat stress index and human mortality in Toronto. *Environ Res*, 2003, 93:9-19.
  36. Tanaka M. Heat stress standard for hot work environments in Japan. *Ind Health*, 2007, 45:85-90.
  37. Belelli D, Herd MB, Mitchell EA. Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: mechanisms of action and physiological relevance. *Neuroscience*,
  38. Higashi T, Takido N, Shimada K. Studies on neurosteroids XVII. Analysis of stress-induced changes in neurosteroid levels in rat brains using liquid chromatography-electron capture atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Steroids*, 2005, 70:1-11.
  39. Yehuda R, Bierer LM, Sarapas C, Makotkine I, Andrew R, Seckl JR. Cortisol metabolic predictors of response to psychotherapy for symptoms of PTSD in survivors of the World Trade Center attacks on September 11, 2001. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, 34:1304-13.
  40. Mahendroo MS, Cala KM, Landrum DP, Russell DW. Fetal death in mice lacking 5alpha-Reductase type 1 caused by estrogen excess. *Mol Endocrinol*, 1997, 11:917-927.
  41. Poletti A, Coscarella A, Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Martini L. 5 alpha-Reductase isozymes in the central nervous system. *Steroids*, 1998, 63:246-251.

42. Torres JM, Ruiz E, Ortega E. Development of a quantitative RT-PCR method to study 5alpha-Reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status. *Prostate*, 2003, 56:74-79.
43. Ordyan NE, Pivina SG. Anxiety levels and neurosteroid synthesis in the brains of prenatally stressed male rats. *Neurosci Behav Physiol*, 2003, 33:899-903.
44. Torres JM, Ruiz E, Ortega E. Effects of CRH and ACTH administration on plasma and brain neurosteroid levels. *Neurochem Res*, 2001, 26:555–558.
45. Luu-The V, Pelletier G, Labrie F. Quantitative appreciation of steroidogenic gene expression in mouse tissues: new roles for type 2 5alpha-reductase, 20alphahydroxysteroid dehydrogenase and estrogen sulfotransferase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 93:269–276
46. Negri-Cesi P, Poletti A, Celotti F. Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5alpha-Reductase and Aromatase in brain differentiation and functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1996, 58:455-466.
47. Cervilla JA, Molina E, Rivera M, Torres-Gonzalez F, Bellon JA, Moreno B, Luna JD, Lorente JA, Mayoral F, King M, Nazareth I. The risk for depression conferred by stressful life events is modified by variation at the serotonin transporter 5HTTLPR genotype: evidence from the Spanish PREDICT-Gene cohort. *Mol. Psychiatry*, 2007, 12:748-755.
48. Weissman MM, Neria Y, Das A, Feder A, Blanco C, Lantigua R, Shea S, Gross R, Gameraff MJ, Pilowsky D, Olfson M. Gender differences in posttraumatic stress disorder among primary care patients after the World Trade Center attack of September 11, 2001. *Gend Med*, 2005 2:76-87.

**Nuevas estrategias en el tratamiento del  
cáncer de mama mediante  
nanoplataformas asociadas a  
Doxorrubicina**

**L. Cabeza  
G. Perazzoli  
J.A. Oliver  
C. Jiménez  
I. Zafra  
R. Ortiz  
J. Prados  
C. Melguizo  
J.L. Arias  
A. Ruiz  
A. Aránega**



# Nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer de mama mediante nanoplateformas asociadas a Doxorubicina

Cabeza, L.1, Perazzoli, G.1, Oliver, J.A.1, Jiménez, C.1, Zafra, I.1, Ortiz R.2, Prados, J.1, Melguizo C.1, Arias J.L.2, Ruiz A.3, Aránega A.1

1 Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Universidad de Granada, Granada, España;

2 Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, Jaén, España;

3 Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, 18071, Granada,

*La doxorubicina es uno de los fármacos más efectivos en el tratamiento de cáncer de mama. No obstante, su utilización ha presentado tres grandes inconvenientes: la toxicidad, el desarrollo de resistencia por parte de las células tumorales y su baja especificidad frente a las mismas. En los últimos años se han diseñado sistemas de nanopartículas que intentan salvar estas tres grandes limitaciones causa de la severa restricción del uso clínico de la doxorubicina. Las estrategias de base nanotecnológica han conseguido una mayor concentración intracelular de fármaco, reduciendo considerablemente la aparición de fenómenos de resistencia y aumentando su especificidad mediante el uso de moléculas que facilitan el contacto del fármaco con la célula tumoral o de nanoplateformas que responden a los microambientes tumorales. El objetivo de este trabajo ha sido revisar los principales avances que se han producido en el campo de la nanotecnología aplicada al uso del agente doxorubicina al cáncer de mama.*

*Palabras clave: nanopartículas, doxorubicina, cáncer de mama, p-glicoproteína, resistencia.*

---

## Abreviaturas:

Dox = Doxorubicina

Resistencia a multidroga = MDR

P-glicoproteína = P-gp

Nanopartículas = NPs

Nanopartículas magnéticas = NPMs

Imágenes de resonancia magnética = IRM

Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro = SPIONs

SPIONs pegiladas = DLPs

Nanopartículas sólidas lipídicas = NSLs

NPs híbridas polímero-lípido = NSLPs

Ácido docosahexaenoico = ADH

Receptor 2 del factor de crecimiento

epidérmico humano = HER2

Polietilenglicol = PEG

Chitosán - ácido oleico = OCH

Oligosacárido de chitosán = CSO

Ácidos estéricos = SA

Pluronic85 = P85

N-(2-hidroxipropil) metacrilamida = HPMA

Aminoglutetimida = AGM

Ácido hialurónico = HA

D- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol 1000

succinato = TPGS

Albúmina de suero humano = HSA

Polietilenimina = PEI



## **Introducción**

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres [28]. Su diagnóstico precoz es esencial en el curso pronóstico de esta patología y en consecuencia en la supervivencia de los pacientes [18]. Es la precocidad de este diagnóstico la que condiciona el abordaje terapéutico que puede ser quirúrgico, como primera aproximación, o quimioterápico, radioterápico o una combinación de ambas estrategias, como segunda opción [11]. El citotóxico de elección es la doxorrubicina (Dox) (Fig. 1). Su mecanismo de acción no está dilucidado, aunque parece ser que actúa a nivel de la replicación del ADN inhibiendo la enzima Topoisomerasa II [19]. Sin embargo, numerosos estudios demuestran la falta de selectividad de este agente que puede afectar a tejidos sanos y tumorales. Este hecho es el responsable de la aparición de efectos secundarios no deseados, siendo la cardiotoxicidad uno de los mayores problemas clínicos [80, 61].

Por otra parte, la Doxorrubicina, al igual que otros agentes antitumorales es capaz de inducir resistencia a multidroga (conocido como fenotipo MDR). Debido a este fenómeno, dentro de un mismo tumor, existen células resistentes que son capaces de sobrevivir al tratamiento siendo las responsables del fracaso de la

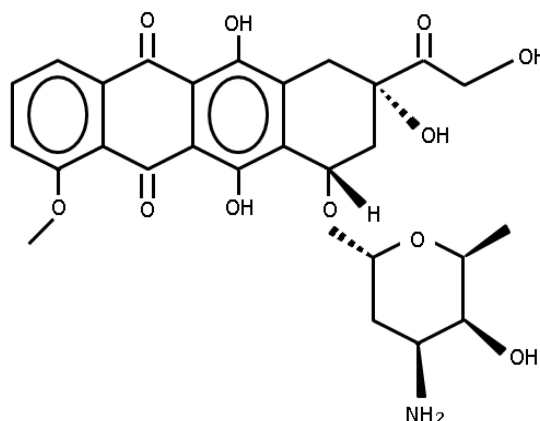


Fig. 1. Molécula de doxorrubicina.

quimioterapia. Estas células con fenotipo MDR presentan alteraciones en el metabolismo del fármaco o en transportadores de membrana como es el caso de P-glicoproteína (P-gp) [70]. En este contexto, las nanopartículas ofrecen la posibilidad de bloquear los mecanismos de resistencia de las células tumorales o, al menos, aumentar la eficacia de estas drogas, incrementando, por tanto su efecto antitumoral.

Por tanto, las nanopartículas (NPs) tienen un enorme potencial tanto en el

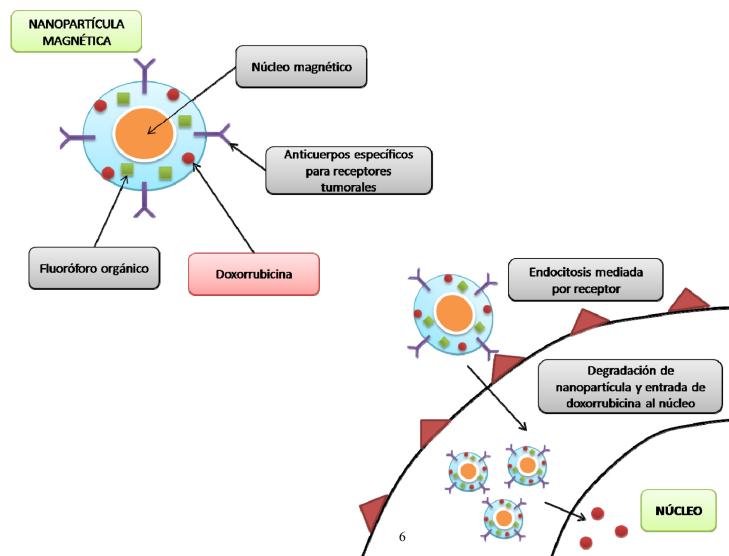
tratamiento y prevención del cáncer, como en la detección y diagnóstico [69, 41]. Los beneficios del uso de NPs como sistemas de liberación de fármacos son entre otros, la mejora de su índice terapéutico, la minimización de sus efectos secundarios y la regulación de su biodistribución [26]. Esto se produce gracias a la capacidad de las NPs para formar complejos con una gran variedad de fármacos a través de enlaces químicos [24] y también en gran medida a la existencia de una amplia variedad de ellas, tanto en composición como en forma. Una de las mayores ventajas del uso de NPs, es que sus propiedades pueden modificarse dependiendo de la aplicación biomédica en la que vayan a ser usadas, lo que conduce a un tratamiento específico y adaptado a cada caso [6].

## **Nanopartículas magnéticas**

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) pueden generarse a partir de distintos elementos metálicos, aunque las más utilizadas incluyen en su estructura un núcleo de óxido de hierro y un recubrimiento polimérico biocompatible, como por ejemplo dextrano o polietilenglicol (PEG) [4, 38, 52]. Su comportamiento es susceptible de manipulación mediante la aplicación de un campo magnético. Muchas de las aplicaciones potenciales que presentan las NPMs se sitúan en el campo de la biomedicina, como su empleo como agente de contraste en la formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) [4, 68], vehículo de fármacos dirigidos magnéticamente [40], en procesos de marcaje y separación celular [13, 53], transfección magnética [58] y produciendo hipertermia local [35] entre otros. Estas aplicaciones pueden combinarse aumentando así las posibilidades que nos ofrecen las NPMs, por ejemplo, combinando su potencial en el transporte de fármacos y sus cualidades de imagen, podrían evaluarse los efectos de la quimioterapia sobre la progresión de la enfermedad, ya que posibilita el seguimiento a tiempo real de la localización del fármaco administrado (Fig. 2) [33, 42].

Debido a la mayor susceptibilidad que presentan los tumores al calor con respecto a los tejidos sanos, en muchas ocasiones su tratamiento se puede

basar en una combinación de quimioterapia y radioterapia con hipertermia; además, se han desarrollado mecanismos de liberación del fármaco ácido dependientes que muestran una combinación potencial con tratamientos de quimioterapia e hipertermia [62]. De hecho, en un estudio publicado en 2011 se sintetizaron complejos de NPMs recubiertas con poli-(ácido metacrílico) conjugadas con Dox, los investigadores testaron estos complejos en distintas condiciones de pH y/o temperatura y observaron, in vitro, una liberación del fármaco más rápida a pH bajo y/o temperatura elevada en líneas humanas de cáncer de mama (MDA-MB-231), demostrando un gran potencial como depósito de fármacos en condiciones fisiológicas, controlando su liberación en presencia de condiciones ácidas, como ocurre en entornos tumorales [77].



**Fig. 2. Modificaciones posibles de la superficie de NPMs.** En este modelo, hay un núcleo magnético recubierto de una superficie formada por un polímero. A esa superficie polimérica se le pueden añadir varios componentes como un fármaco (Dox), anticuerpos para permitir una unión específica con la célula tumoral, además de moléculas fluorescentes que hagan posible su detección.

Otra de las posibles aplicaciones de las NPMs para el tratamiento del cáncer, se basa no solo en dirigir el fármaco a la zona tumoral, sino también en retener dichas nanopartículas por la acción de un campo magnético externo [40, 63]. En este sentido, se han desarrollado nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) [50, 51], que debido a su pequeño tamaño no presentan remanencia magnética. Son muchas las investigaciones relacionadas con las SPIONs, se ha evaluado su uso en terapias dirigidas y como herramientas de diagnóstico [21, 50], además de sus posibles aplicaciones en la

inducción de hipertermia y como agentes de formación de imágenes para IRM [5, 17, 21, 43, 50].

Se han realizado numerosos estudios en líneas celulares de cáncer con este tipo de NPs, un ejemplo de ello es la administración de SPIONs con Dox unida a la superficie mediante un complejo Dox-Fe<sup>2+</sup> en la línea humana de cáncer de mama MCF-7, donde muestran una citotoxicidad tan elevada como la del fármaco en solución, además, la liberación ácido dependiente del fármaco se ve reflejada en experimentos realizados a distintas condiciones de pH, donde los resultados obtenidos mostraron una liberación casi inmediata a pH 4, mientras que a pH fisiológico se liberó el 85% del fármaco. Estos resultados, unidos al incremento de las concentraciones de fármaco en el tumor gracias a la orientación magnética, suponen un gran interés en cuanto al desarrollo de quimioterapia dirigida basada en SPIONs [46].

Otras investigaciones realizadas en este campo muestran SPIONs pegiladas (DLPs), las cuales se estabilizaron en un amplio rango de pH (pH 4-10) [29]. La citotoxicidad in vitro de las DLPs con Dox en la línea MCF-7, muestran una toxicidad equivalente a la del fármaco (Dox) en solución [25]. Con todos estos datos y el hecho de que la superficie de la nanopartícula es biocompatible, existe un gran interés en el futuro desarrollo de esta nanotecnología para posibles aplicaciones in vivo, ya que el estado inmunológico probablemente no se vería comprometido [29], no obstante, se requieren más investigaciones para determinar la citotoxicidad potencial de estos complejos.

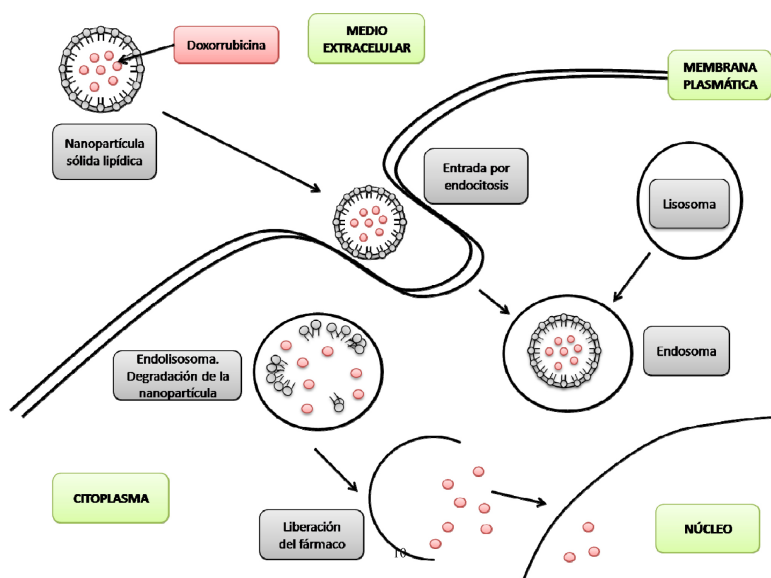
Otro de los aspectos estudiados en el desarrollo del cáncer es la angiogénesis, ya que ésta juega un papel muy importante en el desarrollo y progresión tumoral [12]. Se ha observado que durante este proceso, la integrina  $\alpha\beta 3$  se encuentra sobreexpresada en células tumorales, de modo que podría funcionar como biomarcador selectivo de angiogénesis [30]. En un estudio llevado a cabo en 2013, se generaron magnetoliposomas basados en SPIONs con cualidades superparamagnéticas, biocompatibles y con baja citotoxicidad. Estas SPIONs incluían agentes de contraste para la detección de integrina  $\alpha\beta 3$  en el endotelio angiogénico mediante IRM, mejorando la sensibilidad de la

técnica. Esta estrategia no sólo podría proporcionar una plataforma para la evaluación molecular de la angiogénesis, sino que podría funcionar como un sistema de administración de fármacos contra el cáncer [78].

## **Nanopartículas sólidas lipídicas**

Las nanopartículas sólidas lipídicas (NSLs) son sistemas biodegradables coloidales sólidos formados por lípidos sólidos en el interior y surfactantes anfipáticos en el exterior. Actualmente están siendo muy estudiadas debido a su biocompatibilidad y alta estabilidad, además de su capacidad para transportar fármacos insolubles y protegerlos de su degradación (Fig. 3) [22, 45]. Sin embargo, estas NPs presentan una desventaja y es que son poco eficientes en la incorporación y liberación del fármaco, ya que lo incorporan en poca cantidad y la liberación es repentina. Por ello, son necesarias ciertas modificaciones mediante la adición a la nanopartícula de otros componentes que permitan una mayor incorporación y una liberación sostenida del fármaco [83, 84, 57, 77].

Una primera aproximación es la adición de un polímero aniónico, para hacer posible la unión de moléculas catiónicas solubles como es el caso de la Dox, aumentando de esta manera la eficiencia en su incorporación a la nanopartícula [71,72].



**Fig. 3.** Mecanismo de entrada de las NSLs al interior celular. Las NSLs que llevan encapsulada doxorrubicina entran a las células por endocitosis simple. Una vez dentro de la célula el endosoma se une al lisosoma, formándose el endolisosoma, donde las enzimas líticas comienzan a degradar la nanopartícula, liberando así el fármaco. Una vez libre en el citoplasma, la Dox se dirige hacia su objetivo, el núcleo.

Estas nanopartículas híbridas polímero-lípido (NSLPs) cargadas con Dox, han sido testadas en varios modelos in vitro e in vivo. En el caso de los modelos in vitro, se ha utilizado fundamentalmente la línea humana de cáncer de mama MDA435/LCC6/WT y esta misma línea a la que se ha inducido el fenotipo de MDR mediante una sobreexpresión de P-gp (MDA435/LCC6/MDR1). Los resultados de estos estudios han mostrado que mientras que la Dox sola en la célula resistente se encuentra en una concentración un 30% menor que en la célula wild type; en el caso de la Dox unida a las NPs, casi se equipara la concentración intracelular de Dox en las dos líneas [73], lo que podría significar que las NSLPs, están protegiendo a la Dox de su expulsión de la célula vía P-gp [74]. En relación al fenotipo de resistencia, estas mismas líneas celulares han sido testadas con NSLPs, cuyo polímero aniónico es sulfato de dextrano [71]. En el caso de la línea resistente (MDA435/LCC6/MDR1), la Dox unida a la nanopartícula mostró una alta toxicidad (8 veces más tóxica) en comparación con la Dox por sí sola, sin embargo estas diferencias no se observan en el caso de células no resistentes [73]. Otros estudios con estas líneas celulares se han basado en la coencapsulación en NSLPs de Dox y otros fármacos antitumorales como la mitomicina C [15, 16], atacando ambos fármacos al ADN de la célula tumoral. Estas NPs han mostrado una alta toxicidad de 5 a 10 veces mayor, en comparación con el efecto del tratamiento conjunto de ambos fármacos no encapsulados [60]. La administración a una dosis de 1,2  $\mu$ M es capaz de producir el mismo porcentaje de muerte celular en las células resistentes que en las células wild type.

En cuanto a los estudios in vivo, se han testado NSLPs con Dox encapsulada, en ratones BALB/c a los que se les han inducido tumores mediante inyección intramuscular de la línea de ratón de cáncer de mama EMT6. Mediante el tratamiento intratumoral con estas NPs que portan Dox, se observó una reducción del volumen tumoral casi completa (entre el 70 y el 100%), además de comprobar que se produce una reducción de la toxicidad sistémica producida por la Dox sola [75].

A parte de polímeros aniónicos, las NSLs pueden unirse también a otras moléculas como es el caso de la manosa [32]. Las NSLs con manosa que llevan encapsulada Dox han sido testadas en líneas celulares y en ratones. Se utiliza manosa porque ésta puede aumentar la especificidad de las NPs, ya que al ser un carbohidrato, tiene preferencia a unirse a receptores de lectina, que son altamente expresados por las células tumorales [67, 48], debido a los altos requerimientos nutricionales que precisan por su alta tasa de crecimiento [2]. Los resultados de estudios con estas NPs con Dox recubiertas con manosa, han mostrado en estudios in vivo con ratones BALB/c, que su permanencia en la circulación sanguínea es mayor (48h) en comparación con la Dox sola (12h). Por otra parte la concentración de Dox en órganos como corazón o hígado, disminuye considerablemente cuando se administra encapsulada en las NPs, aumentando así la especificidad del fármaco y reduciendo la cardiotoxicidad [32] uno de los efectos secundarios más graves producidos por el tratamiento con Dox [47], han mejorado la encapsulación de la Dox a NSLs, incorporando a éstas ácidos grasos poliinsaturados como el ácido docosahexaenoico (ADH). En un medio ácido (como el que hay en los tejidos tumorales) NSLs con ADH y Dox liberan un 73% del fármaco en 1h., mientras que a pH fisiológico, liberan solo un 38% de Dox en una hora, en comparación con el 80% de liberación en ese mismo tiempo que tienen las NSLs sin ADH. Este hecho asegura que llegue mayor cantidad de fármaco al tumor y que no se libere en otros tejidos, reduciendo así la toxicidad sistémica. Además en estudios de toxicidad con la línea humana de cáncer de pulmón A549, se ha observado que NSLs con Dox y ADH son hasta 3 veces más efectivas que la Dox y el ADH por sí solos.

Algunas NSLs con Dox [56], han demostrado ser capaces de vencer los mecanismos de resistencia a fármacos de las células tumorales, concretamente la línea MCF-7 resistente a adriamicina, cuya resistencia se basa principalmente en la sobreexpresión de P-gp. En esta línea la incorporación de la Dox unida a las NPs fue 17,1 veces mayor a los 60 min. y 21,6 veces mayor a los 120 min. de exposición al fármaco que con la Dox sola. Además la Dox encapsulada en NSLs aumenta considerablemente la muerte celular por apoptosis en comparación con

la Dox sola, debido a su mayor concentración dentro de la célula y a su rápida entrada [37].

## **Otros nanosistemas para el transporte de doxorubicina**

La creciente aparición en los últimos años de nuevas NPs, modificaciones y mejoras para el transporte de Dox en el tratamiento del cáncer de mama, dificultan su clasificación dentro de los dos grandes grupos mencionados anteriormente, con distinta composición y propiedades [54]. En la tabla que se muestra a continuación hemos agrupado algunos nanosistemas y sus modificaciones, incluyendo su composición, el complejo formado, los resultados observados frente a Dox libre o las ventajas que pueden ofrecer (tabla 1), como es el caso de NPs de HSA que portan Dox, a las que se les une un anticuerpo monoclonal humanizado; el trastuzumab, que se une al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Este factor está sobreexpresado en algunas líneas tumorales como es el caso de la línea de cáncer de mama humano SK-Br-3, mejorando así la especificidad de la NP por la línea tumoral y el efecto citotóxico de la Dox [7]. Diferentes nanosistemas que transportan Doxo se han testado en combinación con una cubierta de polietilenglicol (PEG), para aumentar su tiempo de permanencia en la circulación sanguínea y su tolerancia por el sistema inmune [59, 25]. Encontramos resultados in vitro e in vivo de micelas formadas por chitosán y ácido esteárico. Éstas, muestran eficacia a la hora de superar la resistencia a fármacos de la línea MCF-7 resistente a adriamicina y en estudios con ratones se demostró, una inhibición significativa del crecimiento del tumor, además de una reducción de la toxicidad sistémica [31]. Algunos de estos nanosistemas han sido testados en ensayos clínicos (fase I), como el copolímero de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) que lleva Dox unida [64].



**Tabla 1. Otros transportadores para la liberación de doxorrubicina.**

Composición	Complejo	Ventajas	Ref.
HSA con polietilenimina (PEI)	HSA-PEI-Dox	Aumenta la entrada y citotoxicidad de Dox en MCF-7	[1]
Ácido hialurónico (HA)	HA-Dox	Posible mejora de la eficacia en cáncer de mama metastásico	[20,3,8]
Chitosán con ácido oleico (OCH)	OCH-Dox	Inhibe el crecimiento <i>in vitro</i> de líneas tumorales	[81]
Oligosacárido de chitosán (CSO) y ácido esteárico (SA)	SA-CSO-Dox	<i>In vitro</i> , son capaces de revertir el fenotipo de resistencia en MCF-7. <i>In vivo</i> muestran la misma eficacia en la reducción del volumen tumoral	[79, 31]
Chitosán con O-Succinil	O-succinil-chitosan-Dox	Reduce la IC <sub>50</sub> 3,6 veces en MCF-7	[55, 49]
N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA)	HPMA-Dox	Actividad en pacientes con cáncer de mama resistente a fármacos (ensayo clínico en fase I)	[64]
Transportadores con Polietilenglicol (PEG)	NPMs-PEG-Dox Liposomas-PEG-Dox NPs-péptido fibronectina-Dox	Influye en la carga, liberación y distribución del fármaco	[59, 25]
Inhibidor de la aromatasas aminoglucetimidasa (AGM)	AGM-HPMA-Dox	Incrementa la citotoxicidad y disminuye Bcl-2 en MCF-7	[65, 27]
Albúmina de suero humano (HSA) con trastuzumab	HSA-Dox-trastuzumab	Mejora la actividad antiproliferativa de Dox en células SK-Br-3	[7]
Pluronic85(P85)	P85-Dox	Previene el desarrollo de MDR en MCF-7	[36, 10]
D- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato (TPGS)	TPGS-Dox	Liberación más eficaz, amplia distribución en las células y disminución de la IC <sub>50</sub> en MCF-7	[23, 14]

## **Conclusión**

Las nanopartículas son la próxima generación de tratamiento, actualmente en fase de desarrollo, que confiere grandes ventajas frente a otras terapias, reduciendo en muchos casos la dosis de fármaco necesaria para ejercer su efecto citotóxico. Este hecho combinado con sus prometedoras características tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja

inmunogenicidad y posible direccionamiento mediante campos magnéticos permitirán en un futuro avanzar en la lucha contra el cáncer. Paralelamente, la aparición de nuevos biomarcadores y la conjugación de éstos a las NPs, hacen posible abordar el cáncer de mama de forma más específica y segura. Todos estos avances conseguirán reducir los efectos citotóxicos en tejido normal gracias a su elevada bioespecificidad, disminuyendo así, los efectos secundarios de los fármacos utilizados en la actualidad. Estas nuevas estrategias terapéuticas abren las puertas a la aparición de futuras terapias más específicas y eficientes, acercándonos más a una posible cura del cáncer de mama.

## **Referencias**

1. Abbasi, S, Paul A, Shao W, Prakash S: Cationic albumin nanoparticles for enhanced drug delivery to treat breast cancer: preparation and in vitro assessment. *J. Drug Deliv.* 2012, 2012, 1-8.
2. Agarwal A, Covic L, Sevigny LM, Kaneider NC, Lazarides K, Azabdaftari G, Sharifi S, Kuliopulos A: Targeting a metalloprotease-PAR1 signaling system with cell-penetrating pepducins inhibits angiogenesis, ascites, and progression of ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2008, 7(9), 2746-2757.
3. Ahrens T, Assmann V, Fieber C, Termeer C, Herrlich P, Hofmann M, Simon JC: CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *J. Invest. Dermatol.*, 2001, 116(1), 93-101.
4. Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lubbe AS: Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.*, 2000, 60(23), 6641-6648.
5. Alexiou C, Schmid RJ, Jurgons R, Kremer M, Wanner G, Bergemann C, Huenges E, Nawroth T, Arnold W, Parak FG: Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *Eur. Biophys. J.*, 2006, 35(5), 446-450.
6. Allen TM: Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2(10), 750-763.
7. Anhorn MG, Wagner S, Kreuter J, Langer K, von Briesen H: Specific targeting

- of HER2 overexpressing breast cancer cells with doxorubicin-loaded trastuzumab-modified human serum albumin nanoparticles. *Bioconjug. Chem.*, 2008, 19(12), 2321-2331.
8. Asplund T, Heldin P: Hyaluronan receptors are expressed on human malignant mesothelioma cells but not on normal mesothelial cells. *Cancer Res.*, 1994, 54(16), 4516-4523.
  9. Beardsley TA: War not won. *Sci. Am.*, 1994, 270(1), 130-138.
  10. Bergers G, Benjamin LE: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2003, 3(6), 401-410.
  11. Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, Kabanov AV: Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *Br. J. Cancer*, 2001, 85(12), 1987-1997.
  12. Batrakova EV, Kelly DL, Li S, Li Y, Yang Z, Xiao L, Alakhova DY, Sherman S, Alakhov VY, Kabanov AV: Alteration of genomic responses to doxorubicin and prevention of MDR in breast cancer cells by a polymer excipient: pluronic P85. *Mol. Pharm.*, 2006, 3(2), 113-123.
  13. Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, Zywicke H, Miller B, van Gelderen P, Moskowitz BM, Duncan ID, Frank JA: Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19(12), 1141-1147.
  14. Cao N, Feng SS: Doxorubicin conjugated to D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS): conjugation chemistry, characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Biomaterials*, 2008, 29(28), 3856-3865.
  15. Cheung RY, Rauth AM, Yu Wu X: In vivo efficacy and toxicity of intratumorally delivered mitomycin C and its combination with doxorubicin using microsphere formulations. *Anticancer Drugs*, 2005, 16(4), 423-433.
  16. Cheung RY, Rauth AM, Ronaldson PT, Bendayan R, Wu XY: In vitro toxicity to breast cancer cells of microsphere-delivered mitomycin C and its combination with doxorubicin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2006, 62(3), 321-331.
  17. Corot C, Robert P, Idee JM, Port M: Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, 58(14), 1471-1504.
  18. Dale LC, Gotay CC: The Relationship between Complementary and Alternative Medicine Use and Breast Cancer Early Detection: A Critical Review. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012:506978. doi: 10.1155/2012/506978. Epub 2012 Dec 19.
  19. Denard B, Ching L, Jin Ye: Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *eLife* 2012;1:e00090. DOI: 10.7554/eLife.00090

20. Dietrich A, Tanczos E, Vanscheidt W, Schopf E, Simon JC: High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. *Eur. J. Cancer*, 1997, 33(6), 926-930.
21. Duguet E, Vasseur S, Mornet S, Devoisselle JM: Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine (Lond)*, 2006, 1(2), 157-168.
22. Ekambaram P, Hasan AS, Priyanka K: Solid lipid nanoparticles: a review. *Sci. Revs. Chem. Commun.*, 2012, 2(1), 80-102.
23. Fischer JR, Harkin KR, Freeman LC: Concurrent administration of water-soluble vitamin E can increase the oral bioavailability of cyclosporine a in healthy dogs. *Vet. Ther.*, 2002, 3(4), 465-473.
24. Freitas C, Muller RH: Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1999, 47(2), 125-132.
25. Gautier J, Munnier E, Paillard A, Herve K, Douziech-Eyrolles L, Souce M, Dubois P, Chourpa I: A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. *Int. J. Pharm.*, 2012, 423(1), 16-25.
26. Goldberg M, Langer R, Jia X: Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2007; 18: 241-268.
27. Greco F, Vicent MJ, Gee S, Jones AT, Gee J, Nicholson RI, Duncan R: Investigating the mechanism of enhanced cytotoxicity of HPMA copolymer-Dox-AGM in breast cancer cells. *J. Control Release*, 2007, 117(1), 28-39.
28. Harbeck N, Salem M, Nitz U, Gluz O, Liedtke C: Personalized treatment of early-stage breast cancer: present concepts and future directions. *Cancer Treat. Rev.*, 2010, 36(8), 584-594.
29. Herve K, Douziech-Eyrolles L, Munnier E, Cohen-Jonathan S, Souce M, Marchais H, Limelette P, Warmont F, Saboungi ML, Dubois P, Chourpa I: The development of stable aqueous suspensions of PEGylated SPIONs for biomedical applications. *Nanotechnology*, 2008, 19(46), 465608-465615.
30. Hood JD, Cheresch DA: Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2(2), 91-100.
31. Hu FQ, Liu LN, Du YZ, Yuan H: Synthesis and antitumor activity of doxorubicin conjugated stearic acid-g-chitosan oligosaccharide polymeric micelles. *Biomaterials*, 2009, 30(36), 6955-6963.
32. Jain A, Agarwal A, Majumder S, Lariya N, Khaya A, Agrawal H, Majumdar S, Agrawal GP: Mannosylated solid lipid nanoparticles as vectors for site-specific delivery of an anti-cancer drug. *J. Control Release*, 2010, 148(3), 359-367.

33. Jain TK, Richey J, Strand M, Leslie-Pelecky DL, Flask CA, Labhasetwar V. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials*, 2008, 29(29), 4012-4021.
34. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011; 61: 69-90.
35. Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, Feussner A, Waldofner N, Scholz R, Deger S, Wust P, Loening SA, Jordan A: Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperthermia*, 2005, 21(7), 637-647.
36. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY: Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2002, 54(5), 759-779.
37. Kang KW, Chun MK, Kim O, Subedi RK, Ahn SG, Yoon JH, Choi HK: Doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer therapy. *Nanomedicine*, 2010, 6(2), 210-213.
38. Kohler N, Sun C, Fichtenholtz A, Gunn J, Fang C, Zhang M. Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. *Small*, 2006, 2(6), 785-792.
39. Lubbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, Matthias M, Dorken B, Herrmann F, Gurtler R, Hohenberger P, Haas N, Sohr R, Sander B, Lemke AJ, Ohlendorf D, Huhnt W, Huhn D: Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.*, 1996, 56(20), 4686-4693.
40. Lubbe AS, Alexiou C, Bergemann C: Clinical applications of magnetic drug targeting. *J. Surg. Res.*, 2001, 95(2), 200-206.
41. Maeda H: The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.*, 2001, 41, 189-207.
42. Medarova Z, Pham W, Kim Y, Dai G, Moore A: In vivo imaging of tumor response to therapy using a dual-modality imaging strategy. *Int. J. Cancer*, 2006, 118(11), 2796-2802.
43. Moghimi SM, Kissel T: Particulate nanomedicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, 58(14), 1451-1455.
44. Momparler RL, Karon M, Siegel SE, Avila F: Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res.*, 1976, 36(8), 2891-2895.
45. Muller RH, Mader K, Gohla S: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000, 50(1), 161-177.
46. Munnier E, Cohen-Jonathan S, Linassier C, Douziech-Eyrolles L, Marchais H,

- Souce M, Herve K, Dubois P, Chourpa I: Novel method of doxorubicin-SPION reversible association for magnetic drug targeting. *Int. J. Pharm.*, 2008, 363(1-2), 170-176.
47. Mussi SV, Silva RC, Oliveira MC, Lucci CM, Azevedo RB, Ferreira LA. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013, 48(1-2), 282-290.
48. Nag A, Ghosh PC: Assessment of targeting potential of galactosylated and mannosylated sterically stabilized liposomes to different cell types of mouse liver. *J. Drug Target*, 1999, 6(6), 427-438.
49. Naruphontjirakul P: Development of doxorubicin–core shell O-succinyl chitosan graft pluronic®127 copolymer nanoparticles to treat human cancer. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2011, 1(2), 131-136.
50. Neuberger D, Wong J: Suspension for intravenous injection: image analysis of scanning electron micrographs of particles to determine size and volume. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 2005, 59(3), 187-199.
51. Neuberger T, Schopf B, Hofmann H, Hofmann M, von Rechenberg B: Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, 293(1), 483-496.
52. Okon E, Pouliquen D, Okon P, Kovaleva ZV, Stepanova TP, Lavit SG, Kudryavtsev BN, Jallet P. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab. Invest.*, 1994, 71(6), 895-903.
53. Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, Cudjoe KS, Hornes E, Ugelstad J, Uhlen M: Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, 7(1), 43-54.
54. Prados J, Melguizo C, Ortiz R, Vélez C, Álvarez, Arias JL, Ruíz MA, Gallardo V, Aránega A: Doxorubicin-loaded nanoparticles: new advances in breast cancer therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2012, 12(9), 1058-1070.
55. Pruitt JD, Hussein G, Rapoport N, Pitt WG: Stabilization of pluronic P-105 micelles with an interpenetrating network of N,N-Diethylacrylamide. *Macromolecules*, 2000, 33(25), 9306-9309.
56. Robhash LS, Keon WK, Hoo-Kyun C: Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. *Pharm. Sci.*, 2009, 37, 508-513.
57. Santander-Ortega MJ, Stauner T, Loretz B, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-Gonzalez D, Wenz G, Schaefer UF, Lehr CM: Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. *J. Control Release*, 2010, 141(1), 85-92.

58. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, Gansbacher B, Plank C: Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, 2002, 9(2), 102-109.
59. Shroff K, Kokkoli E: PEGylated liposomal doxorubicin targeted to  $\alpha 5\beta 1$ -expressing MDA-MB-231 breast cancer cells. *Langmuir*, 2012, [Epub ahead of print].
60. Shuhendler AJ, Cheung RY, Manias J, Connor A, Rauth AM, Wu XY: A novel doxorubicin-mitomycin C co-encapsulated nanoparticle formulation exhibits anti-cancer synergy in multidrug resistant human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2010, 119(2), 255-269.
61. Takemura G, Fujiwara H: Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 2007, 49(5), 330-352.
62. Tannock IF, Rotin D: Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.*, 1989, 49(16), 4373-4384.
63. Torchilin VP: Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, 58(14), 1532-1555.
64. Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R, Thomson AH, Murray LS, Hilditch TE, Murray T, Burtles S, Fraier D, Frigerio E, Cassidy J: Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5(1), 83-94.
65. Vicent MJ, Greco F, Nicholson RI, Paul A, Griffiths PC, Duncan R: Polymer therapeutics designed for a combination therapy of hormone-dependent cancer. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005, 44(26), 4061-4066.
66. Vidal S, Carvalho R, de Oliveira MC, Madeira C, Bentes R, Miranda LA: New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013, 48, 282-290.
67. Wadhwa MS, Rice KG: Receptor mediated glycotargeting. *J. Drug Target*, 1995, 3(2), 111-127.
68. Wang YX, Hussain SM, Krestin GP: Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.*, 2001, 11(11), 2319-2331.
69. Wang Y, Wei X, Zhang C, Zhang F, Liang W: Nanoparticle delivery strategies to target doxorubicin to tumour cells and reduce side effects. *Therapeutic Delivery*, 2010, 1(2), 273-287.
70. Wesolowska O: Interaction of phenothiazines, stilbenes and flavonoids with multidrug resistance-associated transporters, P-Glycoprotein and MRP1.

- Acta Biochim. Pol. 2011; 58: 433-448.
71. Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Wu XY: Development of solid lipid nanoparticles containing ionically complexed chemotherapeutic drugs and chemosensitizers. *J. Pharm. Sci.*, 2004, 93(8), 1993-2008.
  72. Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Xue HY, Babakhanian K, Wu XY: A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, 317(3), 1372-1381.
  73. Wong HL, Rauth AM, Bendayan R, Manias JL, Ramaswamy M, Liu Z, Erhan SZ, Wu XY: A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharm. Res.*, 2006, 23(7), 1574-1585.
  74. Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Wu XY: Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. *J. Control Release*, 2006, 116(3), 275-284.
  75. Wong HL, Rauth AM, Bendayan R, Wu XY: In vivo evaluation of a new polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) formulation of doxorubicin in a murine solid tumor model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2007, 65(3), 300-308.
  76. Wu L, Tang C, Yin C: Folate-mediated solid-liquid lipid nanoparticles for paclitaxel-coated poly(ethylene glycol). *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2010, 36(4), 439-448.
  77. Wuang SC, Neoh KG, Kang ET, Leckband DE, Pack DW: Acid-Sensitive Magnetic Nanoparticles as Potential Drug Depots. *AIChE J.*, 2011, 57(6), 1638-1645.
  78. Yan C, Wu Y, Feng J, Chen W, Liu X, Hao P, Yang R, Zhang J, Lin B, Xu Y, Liu R: Anti- $\alpha v \beta 3$  antibody guided three-step pretargeting approach using magnetoliposomes for molecular magnetic resonance imaging of breast cancer angiogenesis. *Int. J. Nanomedicine*. 2013, 8, 245–255.
  79. You J, Hu FQ, Du YZ, Yuan H: Polymeric micelles with glycolipid-like structure and multiple hydrophobic domains for mediating molecular target delivery of paclitaxel. *Biomacromolecules*, 2007, 8(8), 2450-2456.
  80. Yu JJ, Lee HA, Kim JH, Kong WH, Kim Y, Cui ZY, Park KG, Kim WS, Lee HG, Seo SW: Bio-distribution and anti-tumor efficacy of PEG/PLA nanoparticles loaded doxorubicin. *J. Drug Target*, 2007, 15(4), 279-284.
  81. Zhang J, Chen XG, Li YY, Liu CS: Self-assembled nanoparticles based on hydrophobically modified chitosan as carriers for doxorubicin. *Nanomedicine*, 2007, 3(4), 258-265.
  82. Zhang W, Liu J, Li S, Chen M, Liu H: Preparation and evaluation of stealth Tashinone IIA-loaded solid lipid nanoparticles: Influence of Poloxamer 188



- coating on phagocytic uptake. *J. Microencapsul.*, 2008, 25(3), 203-209.
83. Zhang X, Pan W, Gan L, Zhu C, Gan Y, Nie S: Preparation of a dispersible PEGylate nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with 10-hydroxycamptothecin by spray-drying. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 2008, 56(12), 1645-1650.

## Capítulo 7

# **Memoria de reconocimiento visual y gustativa: comparación entre procesos y mecanismos.**

**B. Gómez-Chacón  
M. Gallo**



# Memoria de reconocimiento visual y gustativa: comparación entre procesos y mecanismos.

Beatriz Gómez-Chacón y Milagros Gallo.

Departamento de Psicobiología. Instituto de Neurociencias "Federico Olóriz". Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM). Universidad de Granada.

E-mail: bgomezchacon@ugr.es; mgallo@ugr.es

*La investigación de los mecanismos cerebrales de la memoria de reconocimiento en modelos animales ha dedicado especial atención a la modalidad visual, siendo escasa la investigación que emplea otras modalidades sensoriales. En este trabajo se describen las tareas empleadas en roedores para estudiar tanto la memoria de reconocimiento de objetos como la memoria gustativa segura resaltando la comparación entre los aspectos procedimentales relevantes para la interpretación de los resultados. Se propone la necesidad de estandarizar las pruebas de memoria de reconocimiento aplicables en roedores a fin de permitir la replicación e integración de los resultados obtenidos en diversos laboratorios.*

*Por otra parte, una revisión del efecto de lesiones, intervenciones farmacológicas y registro de la actividad de la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento de cada modalidad sugiere su participación tanto en la memoria de reconocimiento visual como gustativa, aunque pueda existir regionalización funcional y se requiere más investigación para explicar las discrepancias en torno al proceso específico que sustenta.*

---

## **Contenidos**

1. Concepto de memoria de reconocimiento.
2. Modelos de memoria de reconocimiento en roedores.
  - 2.1. Tarea básica de reconocimiento de objetos.
  - 2.2. Modificaciones de la tarea básica de reconocimiento de objetos.
  - 2.3. Reconocimiento de estímulos gustativos.
- 2.4. Comparación entre tareas de memoria de reconocimiento de objetos y gustativa.
3. Corteza perirrinal y memoria de reconocimiento de objetos.
4. Corteza perirrinal y memoria de reconocimiento de sabores.
5. Implicación de la corteza perirrinal en memoria de reconocimiento de objetos y gustativa: una comparación.
5. Conclusiones.

## **1. Concepto de memoria de reconocimiento.**

La memoria de reconocimiento se define como la capacidad para identificar un ítem o evento como previamente experimentado. Los estudiosos de la cognición han dedicado una gran atención especialmente a la memoria de reconocimiento visual en humanos, primates y palomas [26]. Sin embargo, el interés por la memoria de reconocimiento en roedores es relativamente reciente y sólo en la última década se ha desarrollado una intensa investigación en el campo de las Neurociencias dirigida a estudiar las áreas y circuitos cerebrales responsables.

La interpretación de los resultados obtenidos con las tareas desarrolladas para evaluar este tipo de memoria ha dado lugar a intensas discusiones teóricas sobre el tipo de procesos involucrados. En función de la tarea empleada puede interpretarse que la memoria de reconocimiento está basada bien en la familiaridad, la cual no requiere conciencia en el ser humano, o bien en el recuerdo. Este último implica conciencia en seres humanos, no necesita ensayos repetidos e incluye contenidos de diversas modalidades sensoriales junto a información espacial y temporal. La disociación entre familiaridad y recuerdo involucra la participación de tipos de memoria de distinto orden dentro de las clasificaciones dicotómicas actuales [54]. Por una parte, el desarrollo de la familiaridad se refiere a un proceso de habituación que reduce la respuesta ante la novedad de un estímulo y está incluido entre los procesos de aprendizaje que dan lugar a memoria no declarativa o implícita. Por otra parte, el recuerdo hace referencia a la denominada memoria episódica, un tipo de memoria declarativa o explícita que permite recuperar información no solo de los estímulos sino también espacial y temporal de una situación vivida personalmente. Únicamente el recuerdo se ha relacionado tradicionalmente con procesos de memoria dependientes de estructuras del lóbulo temporal [54].

El papel del hipocampo en las tareas de memoria de reconocimiento en roedores ha sido, y sigue siendo en la actualidad, objeto de debate [3, 12, 36, 46]. Sin embargo, se ha acumulado evidencia que apoya la participación de otras

áreas temporales, especialmente la corteza perirrinal (PER) (Figura 1). Se acepta que las exigencias del procedimiento aplicado para evaluar la memoria de reconocimiento determinan el grado en que PER y otras áreas temporales están implicadas.

El objetivo de este trabajo es revisar los conocimientos actuales acerca de la función de PER en la memoria de reconocimiento en roedores, haciendo especial hincapié en la comparación de los resultados obtenidos en la modalidad visual y gustativa, con tradiciones de investigación separadas sin que haya existido interacción entre los campos en que se han desarrollado.

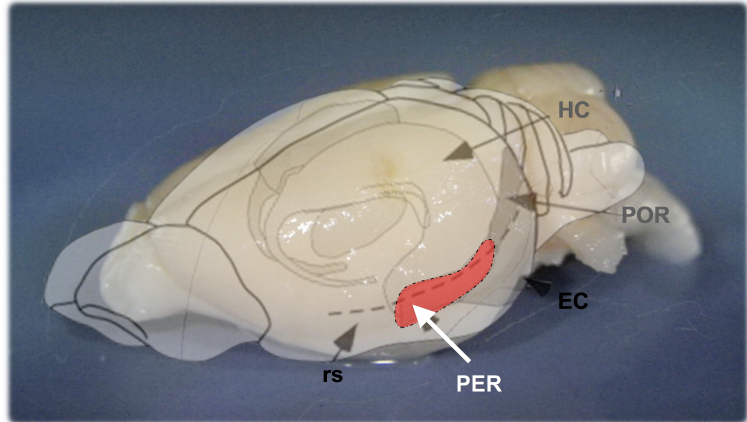


Figura 1.- Localización anatómica de la corteza perirrinal y regiones relacionadas en el cerebro de la rata. HC: hipocampo, POR: corteza postrinal, EC: corteza entorhinal, PER: corteza perirrinal, rs: surco rhinal.

## **2. Modelos de memoria de reconocimiento en roedores.**

Las tareas aplicadas en roedores para estudiar los mecanismos cerebrales responsables de la memoria de reconocimiento han explorado tradicionalmente el reconocimiento de objetos a través de la modalidad visual. Sin embargo, en los últimos años se han introducido modificaciones y nuevas tareas que pueden implicar otras modalidades sensoriales o incluir reconocimiento de información adicional presente en la situación experimental. Las características precisas de la tarea comportamental aplicada adquieren

connotaciones críticas cuando se trata de identificar el papel de una zona cerebral en la memoria de reconocimiento puesto que pueden involucrar procesos que dependan de diferentes mecanismos cerebrales. A continuación se revisan los procedimientos comportamentales empleados resaltando las variables que pueden resultar críticas a la hora de interpretar los resultados de las intervenciones cerebrales.

## 2.1. Tarea básica de reconocimiento de objetos.

La tarea estándar empleada para evaluar memoria de reconocimiento visual en roedores fue propuesta por Ennaceur y Delacour en 1988 [23], aprovechando su tendencia innata a pasar mayor tiempo explorando objetos novedosos que familiares. Dado que se considera que depende de una respuesta espontánea inducida por la novedad que no requiere entrenamiento previo, se ha denominado en inglés “spontaneous object recognition” (SOR). En ocasiones se utiliza como sinónimo de SOR el término “preferencia por la novedad” [44].

El procedimiento general se lleva a cabo en un campo abierto cuadrangular e incluye al menos dos sesiones (Figura 2) después de haber familiarizado al animal con el aparato y la habitación en que se encuentra. En la sesión de adquisición se permite al roedor explorar dos objetos idénticos durante un periodo de tiempo. La sesión de prueba se aplica después de un periodo de retención variable según el objeto de estudio. En ésta, uno de los objetos es sustituido por uno desconocido para el animal y se registra el tiempo de exploración tanto del objeto familiar como del novedoso. Si los animales

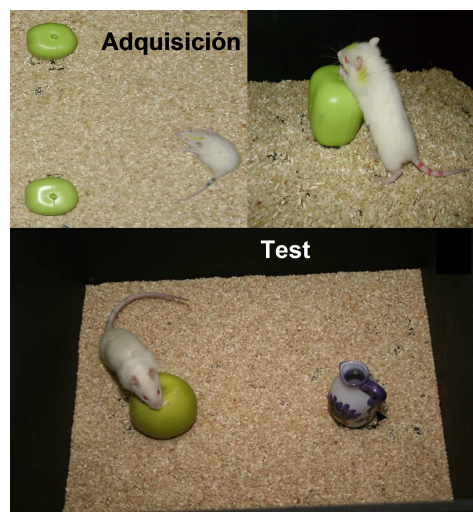


Figura 2.- Procedimiento estándar con objetos de la vida diaria para evaluar la memoria de reconocimiento de objetos espontánea (SOR).

dedican más tiempo a explorar el objeto novedoso que no habían examinado previamente, se puede inferir que recuerdan el objeto familiar.

Aunque la tarea es aparentemente sencilla, modificaciones más o menos sutiles en algunos parámetros pueden ser críticas a la hora de determinar su eficacia o la implicación de determinados circuitos cerebrales.

En primer lugar, la tarea está concebida para ser aplicada en un único ensayo. En cualquier caso, es importante que el roedor sea sometido a un único ensayo diario a fin de que el comportamiento exploratorio no se habitúe y la tasa de exploración sólo alcance valores mínimos no utilizables [17]. Por otra parte, el empleo de sesiones múltiples de adquisición no es recomendable, puesto que presumiblemente podría poner en marcha procesos de aprendizaje y memoria independientes implicando la participación de áreas cerebrales diferentes. Sin embargo, en ocasiones se emplean sesiones de prueba repetidas a distintos intervalos después de la adquisición para evaluar la duración de la retención [19]. En estos casos se incluye un objeto novedoso diferente en cada prueba, pero el objeto familiar sigue siendo el mismo. En nuestro laboratorio hemos obtenido datos que desaconsejan la exploración del efecto del intervalo de retención en los mismos animales empleando diseños intrasujetos. De hecho, la tarea se facilita al incrementar la familiaridad del objeto conocido y los resultados de intervenciones difieren de los obtenidos empleando diseños entregrupos.

En segundo lugar, la duración del intervalo de retención determina el tipo de proceso involucrado en la tarea. El empleo de intervalos cortos en el rango de segundos y minutos permite explorar las capacidades perceptivas, lo cual puede ser un objetivo en sí mismo [9] o puede emplearse como tarea control para confirmar que el sujeto es capaz de discriminar entre los objetos a recordar. La aplicación de la tarea al estudio de la memoria suele emplear intervalos de retención que oscilan entre varias horas y días.

En tercer lugar, en la actualidad se está dedicando especial atención al tratamiento del animal durante el periodo de dilación entre la fase de adquisición y la de prueba. Dado que se trata de una tarea de memoria visual los estímulos visuales extraños a los que el animal está expuesto durante estos periodos



pueden inducir efectos de interferencia en la medida en la que compartan rasgos con el objeto a recordar. Esta cuestión suele controlarse cubriendo las jaulas o manteniendo al sujeto en oscuridad, lo que es más complicado cuando se trata de dilaciones largas.

Un cuarto aspecto hace referencia no tanto al procedimiento conductual como al análisis de los resultados obtenidos. Junto al análisis de los tiempos de exploración de cada objeto, frecuentemente se utilizan una serie de transformaciones que permiten poner en relación los tiempos de exploración del objeto familiar versus el novedoso y obtener una tasa única. Aunque dichas transformaciones pueden ser útiles para reducir variabilidad y eliminar efectos producidos por variables extrañas que afecten a la ejecución, su empleo debe ser cuidadoso. A partir de una comparación entre el análisis de los datos directos y tres de las tasas más empleadas, nuestro grupo ha demostrado que la elección de la tasa puede modificar las conclusiones acerca de los efectos de la variable independiente [30].

Por último, a nuestro entender las características de los objetos empleados en la tarea SOR es una de las cuestiones de mayor relevancia que, sin embargo, no ha sido objeto de estudio excepto en aquellas investigaciones dirigidas a explorar las capacidades perceptivas. Se emplea una diversidad de objetos que a menudo no son descritos con precisión en los trabajos publicados y en ocasiones de diversa disponibilidad dependiendo de los países, lo que dificulta la replicación de los resultados y puede conducir a interpretaciones confusas. Los objetos empleados pueden clasificarse en tres categorías: objetos de la vida diaria (Figura 2), formas geométricas tridimensionales (Figura 3, arriba) y objetos compuestos de piezas de Lego

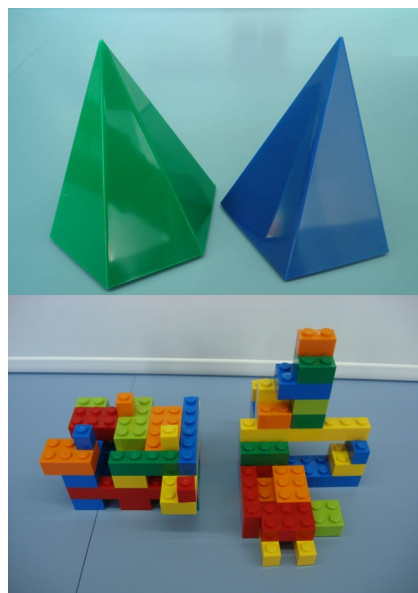


Figura 3.- Formas geométricas (arriba) y figuras complejas compuestas de piezas Lego (abajo). Modificado de [30].

(Figura 3 abajo). Aspectos como las diferencias en tamaño, forma y color entre la pareja de objeto novedoso y familiar empleados pueden determinar el tipo de proceso y área cerebral implicado en la tarea. En este sentido, el papel de la similaridad y complejidad de los objetos se ha revelado de especial importancia cuando se trata de explorar el papel de la corteza perirrinal en tareas SOR [25, 22, 47, 50, 60, 59,14, 8, 20]. Resultados similares se han obtenido en nuestro laboratorio al investigar los efectos de la edad en memoria de reconocimiento visual [30].

## **2.2. Modificaciones de la tarea básica de reconocimiento de objetos.**

Aunque la tarea SOR típicamente emplea un campo abierto, existen versiones en las que se utiliza un laberinto en Y [29, 60] o una plataforma elevada [24]. Una versión más compleja del procedimiento estándar, que combina características de la tarea de desigualación a la muestra demorada con la exploración espontánea, es la desarrollada por Albasser et al. [6]. Entre las modificaciones a destacar se incluyen la sustitución del campo abierto cuadrangular por un laberinto que consiste en un corredor estrecho cuyos dos extremos finalizan en un espacio triangular. En cada espacio triangular se pueden colocar dos objetos separados parcialmente por una pared. El procedimiento incluye el reforzamiento de la conducta exploratoria, ya que todos los objetos se sitúan sobre comederos cebados a los que el animal accede desplazándolos. Además requiere una fase de entrenamiento previo para que el animal se desplace por el laberinto y explore las cuatro posibles localizaciones del objeto. El reforzamiento de la conducta exploratoria permite múltiples ensayos con pares de objetos diferentes, evitando los problemas de habituación. De hecho la tarea incluye familiarización con un gran número de pares de objetos de la vida diaria que pueden diferenciarse en cuanto a las características visuales (forma, tamaño, color), textura y olor.

Esta tarea ha sido aplicada a la investigación del papel de las señales

visuales frente tanto a las táctiles, alternando luz y oscuridad durante la adquisición y prueba [4] o realizando todo el entrenamiento en oscuridad [5], como a las olfativas, empleando formas cúbicas con diversos aromas en vez de los objetos. El objetivo de los creadores de este procedimiento es acentuar las diferencias entre la activación cerebral desencadenada por la detección de la novedad y familiaridad a la vez que se iguala el tiempo de exposición y entrenamiento entre los grupos experimentales y controles. Ello contribuye a una mayor actividad cerebral asociada a la tarea. Aunque no puede descartarse que el empleo de ensayos repetidos y la intervención de procesos de reforzamiento añadidos representen factores extraños que impliquen tipos de memoria no comparables con los implicados en la tarea SOR estándar [26] y desencadenen la participación de circuitos cerebrales diferentes de los implicados en la tarea SOR básica, éstos deberían estar igualados en los grupos control y experimental, siendo la exposición al objeto novedoso o familiar lo único que diferiría entre ellos. Además, la tarea incluye también un componente de desplazamiento entre las posiciones del laberinto que, aunque controlado mediante balanceo, implica la activación de circuitos cerebrales involucrados en memoria espacial.

Por otra parte, el papel de la memoria de la localización del objeto se estudia empleando otra modificación de la tarea SOR estándar que fue desarrollada en 1997 [25]. Denominada en inglés “object location recognition memory” (OLR) emplea el mismo par de objetos en las sesiones de adquisición y prueba pero en ésta última uno de ellos es colocado en una posición novedosa dentro del campo abierto. El recuerdo de la posición familiar del objeto da lugar a mayor tiempo de exploración de aquel que ocupa una posición novedosa. Una descripción precisa de las posiciones empleadas, incluyendo distancias, se echa de menos a menudo, ya que las posiciones elegidas determinan la dificultad de la tarea.

Por último, otras modificaciones de la tarea de reconocimiento de objetos hacen hincapié en la capacidad del animal para recordar la localización de varios objetos presentes simultáneamente en la situación de adquisición o el orden

temporal de aparición. En el primer caso, se trata de la tarea denominada “Object-in-place recognition memory” (OPR) que utiliza cuatro objetos dispuestos en las esquinas del campo abierto que cambian de posición durante la prueba. En el segundo caso, la tarea se denomina “temporal order recognition memory” (TOR) y emplea dos sesiones de adquisición previas a una sesión de prueba con una pareja de objetos idénticos de cada sesión, en la que se evalúan capacidades relacionadas con información de presentación de los objetos (recencia, orden, etc,...).

### **2.3. Reconocimiento de estímulos gustativos.**

El estudio de las respuestas comportamentales de los roedores ante la novedad y familiaridad de los sabores así como sus fundamentos cerebrales tiene una larga tradición constituyendo en sí mismo un campo de investigación dentro del ámbito del efecto de la novedad en aprendizaje. Efectivamente, la presentación de sabores desconocidos desencadena una respuesta neofóbica que desaparece a medida que el sabor se convierte en familiar gracias a un proceso de aprendizaje denominado habituación de la neofobia. Sin embargo, no ha sido hasta el año 2004 cuando la habituación de la neofobia gustativa se ha propuesto como modelo de memoria de reconocimiento gustativa segura [11].

La respuesta neofóbica gustativa consiste en una reducción del consumo de un alimento o solución sávido en comparación con las cantidades ingeridas en ulteriores presentaciones cuando el sabor se convierte en familiar y seguro al no haber sido seguida su ingestión de malestar gastrointestinal. Se trata de una respuesta innata adaptativa que contribuye a la supervivencia al evitar la ingestión de grandes cantidades de una sustancia desconocida potencialmente tóxica.

En el laboratorio el procedimiento empleado para estudiar el efecto de la novedad y familiaridad gustativa requiere la privación de agua de los animales que disponen de sesiones diarias en las que se presenta el sabor habitualmente diluido en agua. El tipo de estímulo gustativo puede variar desde los principales

sabores básicos (dulce, salado, amargo y ácido) hasta una variedad de sabores compuestos que se obtienen diluyendo extractos saborizantes disponibles en el mercado para su empleo en la preparación de alimentos o bebidas. Dado que existen preferencias innatas por determinados sabores, tales como salado y dulce, por ejemplo, frente a amargo y agrio, las cantidades ingeridas de un sabor desconocido dependen del estímulo empleado. Por ello, la reducción en el consumo de un sabor durante la primera presentación en comparación con una línea base previa de consumo de agua, índice de neofobia muy empleado en el pasado, ha sido criticado por poder conducir a conclusiones erróneas, especialmente cuando se utilizan sabores con concentraciones agradables al paladar. Hoy se acepta que la demostración de la respuesta neofóbica requiere al menos dos presentaciones en días consecutivos de manera que el consumo se incremente significativamente en la segunda presentación respecto a la primera. Efectivamente, estudios previos han demostrado que basta una presentación para inducir un efecto de familiaridad gustativa evidente no solo en el incremento del consumo sino que también afecta al retraso de aprendizajes posteriores empleando dicho estímulo, como en el caso del fenómeno denominado inhibición latente [39]. Ello no es óbice para que dependiendo de diversos factores el proceso de familiarización pueda continuar en sesiones posteriores. La demostración de que el proceso de familiarización ha alcanzado un techo viene dada por la ausencia de diferencias significativas en el consumo de la solución familiar durante dos sesiones consecutivas. Se han descrito diversos factores, tales como la experiencia previa con otros sabores, la edad [42] y cambios en el contexto espacial [43] y temporal [40] que pueden modificar el efecto de la novedad gustativa, el número de exposiciones necesarias para completar el proceso de habituación y sus consecuencias en aprendizajes ulteriores.

## **2.4. Comparación entre tareas de memoria de reconocimiento de objetos y gustativa.**

La comparación entre las tareas empleadas para estudiar la memoria de reconocimiento de objetos y la de reconocimiento de sabores seguros en roedores permite identificar tanto características compartidas como aspectos peculiares de cada una de ellas.

Por una parte, en ambos casos basta una sola exposición a los estímulos novedosos para que se conviertan en familiares. Sin embargo la familiaridad se refleja en una disminución de la tasa de exploración en el caso de objetos familiares mientras que induce un incremento del consumo en el caso de sabores familiares cuya ingestión no ha producido consecuencias negativas. Es de suponer que la razón de esta discrepancia radique en la diferente relevancia biológica de los estímulos empleados. Mientras que los objetos empleados no desencadenan respuestas neofóbicas [24] y su exploración induce consecuencias neutras para el organismo, las soluciones gustativas producen neofobia y su ingestión induce consecuencias internas relevantes [53]. En el mejor de los casos, la ingestión de la solución gustativa restablece el equilibrio hídrico en animales privados de agua. En el mismo sentido, Ennaceur [26] ha puesto en tela de juicio la validez de la “preferencia por la novedad” como índice de la memoria de reconocimiento, ya que existen casos en que puede hablarse de “preferencia por la familiaridad”, especialmente cuando se trata de estímulos amenazantes, como sería el caso del sabor desconocido. Este autor destaca que el estímulo amenazante atrae la atención sin que exista aproximación física.

Por otra parte, tanto la memoria visual del objeto como la memoria gustativa del sabor incluyen elementos adicionales al estímulo empleado sobre aspectos de la situación en la que se experimentó durante la sesión de familiarización. Ello se pone de manifiesto en tareas modificadas de reconocimiento visual que exploran la memoria del lugar o el contexto en el que se presentó el objeto y el reconocimiento del objeto a través de otras modalidades sensoriales, tales como textura u olor. Del mismo modo, la memoria

gustativa segura resulta afectada por cambios de contexto espacial y temporal. Puede aplicarse la misma consideración de Ennaceur [26] sobre la tarea SOR a la tarea de memoria de reconocimiento gustativa segura. La memoria de la sesión de adquisición implica el recuerdo de un episodio en la vida del animal, pero las tareas básicas sólo evalúan un aspecto de ese episodio, es decir, el recuerdo del objeto o del sabor. En conjunto, tanto la adquisición en un único ensayo como el hecho de que la memoria incluya aspectos de la situación que van más allá del estímulo empleado apoyan una visión de la memoria de reconocimiento tanto visual como gustativa como modelo de memoria episódica basada en el recuerdo más allá de la mera familiaridad.

Adicionalmente, existen diferencias procedimentales entre los modelos animales de reconocimiento de objetos y reconocimiento de sabores seguros que son propias de cada modalidad sensorial y ofrecen ventajas en el último caso.

En primer lugar, habitualmente la precisión en la descripción del estímulo resulta ser mayor en los estudios que emplean soluciones gustativas, lo que permite la replicación precisa. Además, la posibilidad de variar la concentración de la solución permite graduar la respuesta de ingestión con precisión.

En segundo lugar, es más fácil eliminar efectos de interferencia durante los periodos de retención en las tareas de memoria de reconocimiento gustativa. Mientras que resulta imposible evitar la exposición a estímulos visuales, salvo manteniendo a los animales en la oscuridad, es sencillo evitar la exposición a sabores en el agua disponible diariamente sin alterar el ciclo de luz-oscuridad y, por consiguiente, los ritmos biológicos.

Por último, los requisitos motores de las tareas de memoria de reconocimiento gustativa son menores de los que implican las tareas de memoria de reconocimiento de objetos, que al menos exigen desplazamiento en el campo abierto. Ello hace que sean aplicables en animales de edad avanzada sin que resulte afectada la respuesta ante la novedad. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que, en ausencia de experiencias aversivas previas con sabores, ratas envejecidas no difieren de adultas jóvenes en la magnitud de

la respuesta neofóbica [42]. Sin embargo, en algunos casos las ratas envejecidas muestran una reducción en los tiempos de exploración [30] aunque frecuentemente no se describen diferencias [17, 18, 19].

### **3. Corteza perirrinal y memoria de reconocimiento de objetos.**

El hecho de que las tareas de memoria de reconocimiento de objetos en animales surgieran como modelo para estudiar la amnesia humana inducida por daño del lóbulo temporal medial [61] ha dirigido la atención de los investigadores desde el principio al papel de diversas áreas, tales como el hipocampo, corteza parahipocampal y perirrinal. En este sentido se ha producido una gran evolución desde los primeros estudios que atribuían un papel central al hipocampo hasta la actualidad en que los resultados obtenidos en roedores han inclinado el interés hacia la corteza perirrinal [12, 46]. Efectivamente, aunque existe debate sobre la función concreta de la corteza perirrinal, hoy en día está aceptado su papel crucial en los procesos implicados en las tareas de memoria reconocimiento de objetos, dados los hallazgos obtenidos empleando diversas técnicas y aproximaciones.

Existe un gran número de estudios de lesión que interrumpen la memoria de reconocimiento cuando se emplean tareas SOR con objetos fácilmente discriminables en roedores (para una revisión véase [57]). El efecto del daño de la corteza perirrinal afecta a la memoria ya que la lesión no interfiere con la ejecución cuando se emplean dilaciones cortas de menos de cinco minutos. Se trata, por otro lado, de un efecto selectivo sobre los procesos de memoria implicados en la tarea SOR, ya que el daño de la zona no altera la ejecución en tareas de memoria espacial, como la tarea OLR. Sin embargo, las tareas de memoria de reconocimiento que requieren integrar una combinación de informaciones sobre el dónde y cuándo se presentó el objeto y la naturaleza del



mismo, tales como las tareas OPR y TOR, resultan deterioradas en animales lesionados.

Asimismo, la evidencia con estudios de lesiones apoya una función adicional de la corteza perirrinal en procesos visuales perceptivos complejos, ya que, cuando se emplean objetos complejos que introducen ambigüedad en la discriminación, los déficits de ejecución se presentan incluso con dilaciones cortas (para revisiones del tema véanse [10, 55]).

Del mismo modo, los estudios farmacológicos (revisados en [13]) confirman la participación de la corteza perirrinal en los procesos de memoria implicados que requieran información sobre la ocurrencia previa de un objeto, lo que es relevante tanto en la tarea estándar SOR como en las modificaciones OPR y TOR. Aunque se requiere más investigación, los efectos de la inyección en la zona de antagonistas glutamatérgicos, colinérgicos y de canales de calcio dependientes del voltaje tipo-L sugieren la presencia de al menos dos procesos de plasticidad sináptica dissociables en el tiempo que tienen lugar en la corteza perirrinal. Ambos procesos se suceden durante la adquisición y se han propuesto como responsables del almacenamiento de la información requerida en la memoria de reconocimiento de objetos. Asimismo, se están identificando las cascadas intracelulares subyacentes a los procesos de consolidación en la zona.

Por último, el estudio en ratas de la activación neuronal en la corteza perirrinal mediante determinación inmunohistoquímica del gen inmediato temprano c-fos o de su producto la proteína c-Fos muestran un incremento del número de células marcadas durante la presentación de objetos novedosos frente a familiares. Aggleton y Brown [1] informaron que dicho incremento está relacionado selectivamente con la exposición a objetos, ya que cuando se emplean tareas que dependen de información espacial es el hipocampo el que muestra cambios en la expresión de c-fos. Ello es consistente con estudios previos del mismo grupo indicando que estímulos visuales novedosos inducen mayor activación que los familiares en la corteza perirrinal y otras zonas, pero no en el hipocampo [56, 63, 64]. Asimismo, empleando la tarea SOR compleja desarrollada por Albasser et al. [6] que ha sido descrita previamente, se ha

identificado que la mayor actividad c-Fos inducida por la presentación de objetos novedosos se restringe selectivamente a la porción caudal de la corteza perirrinal. Adicionalmente se observa un patrón propio de activación de los subcampos hipocampales ante la novedad del objeto con incrementos de actividad en CA1 y CA3 frente a disminuciones en el giro dentado [6]. Según los autores, éste es el primer informe en el que se confirma simultáneamente la capacidad de los animales para discriminar entre los estímulos. De hecho, en estudios previos se han presentado a las ratas estímulos visuales consistentes en fotos [56, 63] sin pruebas comportamentales de su discriminabilidad.

#### **4. Papel de la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento de sabores.**

Los primeros estudios sobre los sustratos neurales de la memoria de reconocimiento gustativa segura pueden atribuirse a Bures y Buresova, que en la década de 1970 demostraron que diversas intervenciones, incluyendo anestesia general y depresión cortical propagada, interfieren con la atenuación de la neofobia [15, 16]. En las décadas posteriores la mayor parte de la investigación se centró en el papel de la corteza gustativa insular en la codificación de la novedad. Diversos estudios identificaron correlatos corticales de la novedad y familiaridad gustativa en esta zona (para revisiones de los hallazgos durante el siglo XX véase [31, 11]). Posteriormente se obtuvieron datos que apoyaban la implicación de la amígdala en la neofobia gustativa [28, 38, 37, 52] y se han ampliado los conocimientos sobre la función de la corteza insular y los mecanismos neuroquímicos relevantes en la consolidación de la memoria gustativa con especial participación del sistema colinérgico [49] y glutamatérgico. La visión actual propone que la memoria gustativa segura puede depender de una representación neural del sabor almacenada en varias regiones cerebrales [51]. Los resultados apuntan a que la adquisición y consolidación de la memoria de reconocimiento gustativa segura requiera la interacción entre la corteza

insular [48, 27, 34] y la amígdala [35] con otras áreas cerebrales, tales como el núcleo accumbens, hipocampo dorsal, núcleos talámicos [62] y la corteza perirrinal [51]. Dada la participación de la corteza perirrinal en el reconocimiento visual de objetos, adquiere especial relevancia revisar su posible papel en la memoria de reconocimiento gustativa a fin de explorar la posibilidad de que existan mecanismos neurales compartidos.

Los escasos informes publicados hasta la fecha indican la posibilidad de impedir la habituación de la neofobia gustativa mediante la inactivación temporal de la corteza perirrinal aplicando inyecciones locales de anisomicina, inhibidor de la síntesis proteica [21]. La microinyección bilateral se aplicó después de la ingestión de una solución novedosa de sacarina (0.3%) durante 15 minutos. En una sesión de prueba realizada al día siguiente el grupo sometido a la inactivación reversible de PER no mostró incremento en el consumo, comportándose, a diferencia del grupo que recibió inyección de vehículo, como si no hubiera probado antes el sabor. Un resultado similar se obtuvo inactivando el hipocampo dorsal.

Asimismo, microinyecciones bilaterales de escopolamina, antagonista de los receptores muscarínicos colinérgicos, en PER impiden la formación de la memoria gustativa segura si se aplican inmediatamente después de la ingestión de una solución novedosa de sacarina (0.5%) [33]. Estos datos sugieren que la neurotransmisión colinérgica en la corteza perirrinal está implicada en la memoria de reconocimiento gustativo.

Por último, en nuestro laboratorio se ha llevado a cabo el único trabajo que ha evaluado la activación de PER en relación con la memoria de reconocimiento gustativa segura mediante técnicas inmunohistoquímicas [32]. Los resultados han indicado un incremento de la actividad de c-Fos en la zona medial de PER durante la ingestión de una solución de vinagre de sidra (3%) familiar frente a la primera presentación. Dicho incremento no se observa en el hipocampo entre otras zonas control. El estudio tiene el interés adicional de presentar datos conductuales que confirman el proceso de atenuación de la neofobia gustativa. Además, la interrupción de la formación de la memoria

gustativa segura mediante lesiones de la amígdala basolateral anula la activación diferencial inducida por la familiaridad del sabor en PER.

## **5. Implicación de la corteza perirrinal en memoria de reconocimiento de objetos y gustativa: una comparación.**

Una comparación de los efectos de las lesiones, intervenciones farmacológicas y registro de la actividad en la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento en sus modalidades visual y gustativa pone de manifiesto la posibilidad de que existan mecanismos compartidos a pesar de tratarse de tipos de memoria considerados tradicionalmente de distinto rango. La evidencia publicada hasta el momento, a pesar de ser escasa con respecto a la modalidad gustativa, apunta a que en ambos casos la lesión de PER interfiera con la ejecución de las tareas de memoria de reconocimiento. Aunque existe múltiples informes sobre el efecto de lesiones perirrinales sobre la memoria de reconocimiento de objetos (para una revisión [57]), sólo se ha publicado un trabajo empleando lesiones reversibles en el caso de la modalidad gustativa [21]. Del mismo modo, los estudios farmacológicos indican que la neurotransmisión colinérgica en PER es esencial tanto

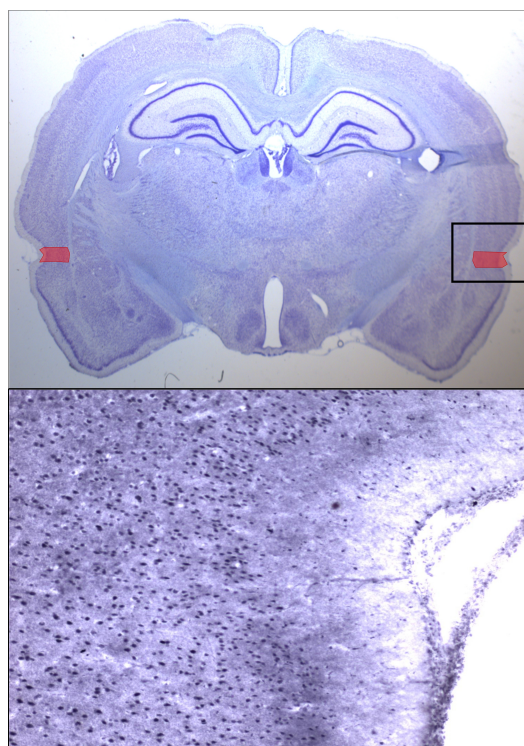


Figura 4.- Arriba: sección coronal del cerebro de la rata teñida con Violeta de Cresilo (2X) en la que se destaca la corteza perirrinal. Abajo: Microfotografía de la corteza perirrinal (20X) mostrando células activadas durante la memoria de reconocimiento mediante tinción inmunohistoquímica de la proteína c-Fos.

para el reconocimiento de estímulos visuales [13, 58] como gustativos [33]. Por último, tanto las tareas de memoria de reconocimiento visual como gustativas inducen activación de c-Fos en la corteza perirrinal (Figura 4).

Sin embargo, los resultados sugieren también disociaciones interesantes. De hecho, el déficit inducido por las lesiones de PER responsable de la incapacidad para ejecutar correctamente las tareas de memoria de reconocimiento parece ser de naturaleza diferente en la modalidad visual y gustativa. En el caso de la memoria de reconocimiento gustativa, la inactivación temporal de la corteza perirrinal después de la sesión de familiarización interrumpe la atenuación de la respuesta neofóbica, haciendo que el animal responda al sabor familiar como si fuera desconocido [21]. En el caso de la memoria de reconocimiento de objetos se ha propuesto que el déficit consiste en la imposibilidad de detectar la novedad, de manera que los animales lesionados se comportan durante la prueba como si los dos objetos fueran familiares [41]. A esta conclusión se ha llegado, empleando un procedimiento ad hoc con un laberinto en Y [41], puesto que una revisión de las publicaciones sobre el efecto de lesiones perirrinales en ratas empleando la tarea SOR estándar pone de manifiesto la imposibilidad de obtener conclusiones en este sentido. La razón viene dada porque habitualmente se emplean tasas sin informar de los datos brutos sobre el tiempo de exploración de cada objeto en la prueba. Ello impide la comparación con el tiempo de exploración del objeto novedoso durante la sesión de adquisición [2, 7, 45, 60]. Además, aunque se informe de los tiempos de exploración durante la familiarización, dado que su duración es típicamente mayor que la de la prueba, no se dispone de datos correspondientes a periodos comparables.

Esta discrepancia puede estar relacionada con el hecho de que la respuesta exploratoria ante la novedad del estímulo es opuesta en función de que se trate de un objeto o de un sabor. En el primer caso, el incremento en la respuesta exploratoria se interpreta como índice de la detección de la novedad del estímulo, mientras que en el segundo es la ausencia o reducción de la respuesta de ingestión la que indica que el sabor ha sido detectado como nuevo.

Por ello, también es opuesta la respuesta que refleja la detección de familiaridad en la siguiente presentación. Como se ha mencionado antes, ello aboga a favor de la propuesta de Ennaceur [26] de evitar el uso del término “preferencia por la novedad” como sinónimo de memoria de reconocimiento, uso que está muy extendido en la actualidad. La comparación de los efectos opuestos de intervenciones cerebrales sugiere que puede tratarse de una cuestión que va más allá de discusiones terminológicas y que debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

En el mismo sentido, los efectos de la novedad y familiaridad del estímulo parecen inducir respuestas opuestas en la actividad c-Fos de la corteza perirrinal. Mientras que en el caso de la memoria de reconocimiento visual se ha descrito repetidas veces un incremento en el número de células marcadas durante la presentación del objeto novedoso con respecto al familiar [1, 6, 64], el único estudio sobre la memoria de reconocimiento gustativa ha obtenido mayor activación durante la presentación del sabor familiar que durante la presentación del novedoso [32]. Además, la región de la corteza perirrinal en la que se ha registrado la activación asociada a la memoria de reconocimiento visual y gustativa no es la misma. Mientras que la ejecución de las tareas de memoria de reconocimiento de objetos está asociada con un incremento del número de células c-Fos en el PER caudal [6], la reducción de la ingestión de un sabor familiar lo está con la región medial [32]. Es necesaria más investigación para dilucidar si existe una especialización funcional en la corteza perirrinal de manera que en función de la modalidad sensorial sean distintas regiones las implicadas en la memoria de reconocimiento.

Con respecto a la discrepancia en la relación de la activación de c-Fos con la detección de la novedad cuando se trata de objetos y de la familiaridad en el caso de los estímulos gustativos pueden proponerse varias explicaciones. Aunque improbable, una primera explicación es que la actividad neural en PER esté implicada en procesos diferentes en cada modalidad. Una segunda explicación podría radicar en que una sola presentación del sabor en la que se consume una cantidad reducida debido al fenómeno de neofobia no es suficiente

para inducir familiaridad con el sabor. Si ello fuera así, en la segunda presentación durante la sesión de prueba el sabor seguiría siendo novedoso, lo que sería congruente con los resultados obtenidos empleando la tarea de reconocimiento de objetos. Aunque los datos conductuales indican que ha bastado una presentación para reducir la respuesta neofóbica [32], ello no descarta que el proceso de familiarización no se haya completado. Por último, una tercera explicación se fundamenta en el hecho de que tanto en la modalidad visual como en la gustativa la mayor actividad c-Fos se produce en las situaciones en las que la conducta de exploración que incluye aproximación y consumo en el caso de los sabores es más elevada. La posibilidad de que la función de la corteza perirrinal esté relacionada más con la conducta de exploración del estímulo que con la detección de la novedad o la familiaridad merece más investigación.

## **6. Conclusiones**

1. En nuestra opinión el campo se beneficiaría del desarrollo de baterías de objetos estandarizadas que permitieran la replicación e integración de los resultados obtenidos en diversos laboratorios.
2. La evidencia revisada pone de manifiesto que las clasificaciones empleadas en el campo de la cognición y el aprendizaje pueden no ser las más adecuadas para interpretar los resultados de las tareas de memoria de reconocimiento. El tipo de memoria evaluado puede variar en función de las tareas aplicadas en sus diferentes versiones.
3. La corteza perirrinal parece jugar un papel crucial tanto en la memoria de reconocimiento visual como gustativa, aunque pueda existir regionalización funcional y se requiere más investigación para explicar las discrepancias en torno al proceso específico que sustenta.

## **Referencias**

1. Aggleton JP, Brown MW. Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Q J Exp Psychol B* 2005; 58: 218–33.
2. Aggleton JP, Keen S, Warburton EC, Bussey TJ. Extensive cytotoxic lesions involving both the rhinal cortices and area TE impair recognition but spare spatial alternation in the rat. *Brain Res Bull* 1997; 43(3):279-87.
3. Ainge JA, Heron-Maxwell C, Theofilas P, Wright P, de Hoz L, Wood ER. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behav Brain Res* 2006; 15, 167(1), 183-195.
4. Albasser MM, Amin E, Iordanova MD, Brown MW, Pearce JM, Aggleton JP. Separate but interacting recognition memory systems for different senses: the role of the rat perirhinal cortex. *Learn Mem* 2011; 18, 435-443.
5. Albasser MM, Olarte-Sánchez CM, Amin E, Horne MR, Newton MJ, Warburton EC, Aggleton JP. The Neural Basis of Nonvisual Object Recognition Memory in the Rat. *Behav Neurosci* 2012. Advance online publication. Doi: 10.1037/a0031216
6. Albasser MM, Poirier GL, Aggleton JP. Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. Familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *Eur J Neurosci* 2010; 31, 134-147.
7. Barker GR, Bird F, Alexander V, Warburton EC. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci* 2007; 14, 27(11), 2948-2957.
8. Bartko SJ, Cowell RA, Winters BD, Bussey TJ, Saksida LM. Heightened susceptibility to interference in an animal model of amnesia: impairment in encoding, storage, retrieval--or all three? *Neuropsychologia* 2010; 48(10):2987-97.
9. Bartko SJ, Winters BD, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Perceptual functions of perirhinal cortex in rats: Zero-delay object recognition and simultaneous oddity discriminations. *J Neurosci* 2007; 27: 2548–2559.
10. Baxter MG. Involvement of medial temporal lobe structures in memory and perception. *Neuron* 2009; 61(5):667-77.
11. Bermudez-Rattoni F. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5:209–17.
12. Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *PNAS* 2004; 101 (40), 14515-14520.
13. Brown MW, Barker GR, Aggleton JP, Warburton EC. What pharmacological interventions indicate concerning the role of the perirhinal cortex in



- recognition memory. *Neuropsychologia* 2012; 50 (13):3122-40.
14. Brown MW, Warburton EC, Aggleton JP. Recognition memory: material, processes, and substrates. *Hippocampus* 2010; 20:1228-44.
  15. Bures J, Buresova O, Krivanek J. *Brain and Behavior: Paradigms for research in neural mechanisms*. John Wiley and Sons 1988: 236-237.
  16. Buresova O, Bures J. The effect of anesthesia on acquisition and extinction of conditioned taste aversion. *Behav Biol* 1977; 20, 41-50.
  17. Burke SN, Ryan L, Barnes CA. Characterizing cognitive aging of recognition memory and related processes in animal models and in humans. *Front Aging Neurosci* 2012; 4:15.
  18. Burke SN, Wallace JL, Hartzell AL, Nematollahi S, Plange K, Barnes CA. Age-associated deficits in pattern separation functions of the perirhinal cortex: a cross-species consensus. *Behav Neurosci* 2011; 125 (6):836-47.
  19. Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, Uprety AR, Barnes CA. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci* 2010; 124(5):559-73.
  20. Cowell, R.A., Bussey, T.J., and Saksida, L.M. Components of recognition memory: dissociable cognitive processes or just differences in representational complexity? *Hippocampus* 2010; 20(11): 1245-1262.
  21. De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermudez-Rattoni F. Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur J Neurosci* 2008; 28:1377–81.
  22. Eacott MJ, Machin PE, Gaffan EA. Elemental and configural visual discrimination learning following lesions to perirhinal cortex in the rat. *Behav Brain Res*. 2001; 124(1):55-70.
  23. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988; 31, 47-59.
  24. Ennaceur A, Michalikova S, Chazot PL. Do rats really express neophobia towards novel objects? Experimental evidence from exposure to novelty and to an object recognition task in an open space and an enclosed space. *Behav Brain Res*. 2009; 197(2):417-34.
  25. Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesion in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res* 1997; 113, 509-519.
  26. Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 2010; 215(2):244-54.
  27. Ferreira G, Gutierrez R, De La Cruz V, Bermudez R. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 1139–1145.
  28. Figueroa-Guzmán Y, Reilly S. NMDA receptors in the basolateral amygdala

- and gustatory neophobia. *Brain Res* 2008; 1210:200–3.
29. Forwood SE, Winters BD, Bussey TJ. Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus* 2005; 15(3):347-55.
  30. Gámiz F, Gallo M. Spontaneous object recognition memory in aged rats: Complexity versus similarity. *Learn Mem* 2012;19(10):444-8.
  31. Gallo M, Ballesteros MA, Molero A, Morón I. Taste aversion learning as a tool for the study of hippocampal and non-hippocampal brain memory circuits regulating diet selection. *Nutr Neurosci* 1999; 2:277–302.
  32. Gómez-Chacón B, Gámiz F, Gallo M. Basolateral amygdala lesions attenuate safe taste memory-related c-fos expression in the rat perirhinal cortex. *Behav Brain Res* 2012; 230(2):418-22.
  33. Gutiérrez R, De la Cruz V, Rodríguez-Ortiz CJ, Bermúdez-Rattoni F. Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learn Mem* 2004; 11:95–101.
  34. Gutierrez R, Rodríguez-Ortiz CJ, De La Cruz V, Nunez-Jaramillo L, Bermúdez- Rattoni F. Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem* 2003; 80:323–31.
  35. Guzmán-Ramos K, Bermúdez-Rattoni F. Post-Learning Molecular Reactivation Underlies Taste Memory Consolidation. *Front Syst Neurosci* 2011; 5: 79.
  36. Iordanova MD, Burnett DJ, Aggleton JP, Good M, Honey RC. The role of the hippocampus in mnemonic integration and retrieval: complementary evidence from lesion and inactivation studies. *Eur J Neurosci* 2009; 30(11):2177-89.
  37. Lin JY, Roman C, Arthurs J, Reilly S. Taste neophobia and c-Fos expression in the rat brain. *Brain Res* 2012; 1448: 82-8.
  38. Lin JY, Roman C, St. Andre J., Reilly S. Taste, olfactory and trigeminal neophobia in rats with forebrain lesions. *Brain Res* 2009, 1251: 195-203.
  39. Lubow, R.E. *Latent Inhibition and Conditioned Attention Theory*. Cambridge: Cambridge University Press: 1989.
  40. Manrique T, Molero A, Ballesteros MA, Moron I, Gallo M, Fenton AA. Time of day-dependent latent inhibition of conditioned taste aversions in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 82, 77–80.
  41. McTighe SM, Cowell RA, Winters BD, Bussey TJ, Saksida LM. Paradoxical false memory for objects after brain damage. *Science* 2010; 330(6009):1408-10.
  42. Morón I, Gallo M. Effect of previous taste experiences on taste neophobia in young-adult and aged rats. *Physiol Behav* 2007; 90, 308-317.
  43. Morón I, Manrique T, Molero A, Ballesteros M A, Gallo M, Fenton A. The

- contextual modulation of conditioned taste aversions by the physical environment and time of day is similar. *Learn Mem* 2002; 9, 218–223.
44. Mumby DG, Gaskin S, Gleen MJ, Schramek TE, Lehmann H. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places and contexts. *Learn Mem* 2002; 9, 49-57.
  45. Mumby DG, Piterkin P, Lecluse V, Lehmann H. Perirhinal cortex damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Behav Brain Res* 2007; 28,185(2), 82-87.
  46. Mumby DG. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav Brain Res* 2001; 127, 159-181.
  47. Murray EA, Richmond BJ. Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(2):188-93.
  48. Naor C, Dudai Y. Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* 1996; 79: 61–67.
  49. Neseliler S, Narayanan D, Fortis-Santiago Y, Katz DB, Birren SJ. Genetically induced cholinergic hyper-innervation enhances taste learning. *Front Syst Neurosci* 2011; 5:97.
  50. Norman G, Eacott MJ. Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. *Behav Brain Res* 2004;148(1-2):79-91.
  51. Pedroza-Llinas R, Ramirez-Lugo L, Guzman-Ramos K, Zavala-Vega S, Bermudez- Rattoni F. Safe taste memory consolidation is disrupted by a protein synthesis inhibitor in the nucleus accumbens shell. *Neurobiol Learn Mem* 2009; 92:45–52.
  52. Reilly S, Bornovalova MA. Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29, 1067-1088.
  53. Scott T. R. Learning through the taste system. *Front. Syst. Neurosci.* 2011; 5:87.
  54. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 82(3):171-7.
  55. Suzuki WA. Perception and the medial temporal lobe: evaluating the current evidence. *Neuron* 2009; 61(5):657-66.
  56. Wan H, Aggleton JP, Brown MW. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci* 1999; 19:1142–8.
  57. Warburton EC, Brown MW. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 2010; 48(8):2262-72.
  58. Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, Barker GR, Aggleton

- JP, Bashir ZI, Brown MW. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron* 2003; 38(6):987-96.
59. Winters BD, Busseyk TJ. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* 2005; 25, 52-61.
60. Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci*. 2004; 24(26):5901-8.
61. Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Implications of animal object memory research for human amnesia. *Neuropsychologia* 2010; 48 (8):2251-61.
62. Yamamoto T, Ueji K. Brain mechanisms of flavor learning. *Front. Syst. Neurosci*. 2011; 5, 76.
63. Zhu XO, Brown MW, McCabe BJ, Aggleton JP. Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in rat brain. *Neuroscience* 1995; 69(3):821-9.
64. Zhu XO, McCabe BJ, Aggleton JP, Brown MW. Mapping visual recognition memory through expression of the immediate early gene c-fos. *Neuroreport* 1996; 7:1871-5.

*Financiado por PSI2011-23702 (MICINN) con fondos FEDER*



## Capítulo 8

# Neuroanatomía funcional de la memoria de reconocimiento visual y gustativa

**E. Morillas  
F. Gámiz  
M. Gallo**



# Neuroanatomía funcional de la memoria de reconocimiento visual y gustativa

Enrique Morillas, Fernando Gámiz y Milagros Gallo.

Departamento de Psicobiología. Instituto de Neurociencias "Federico Olóriz". Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM). Universidad de Granada.

E-mail: emorillas@ugr.es, fernandogamiz@ugr.es, mgallo@ugr.es

*La memoria de reconocimiento, definida como la capacidad para recordar un estímulo o situación previamente vivida se ha explorado en modelos animales empleando la modalidad visual fundamentalmente. Está ampliamente aceptado que el empleo de otras modalidades, tales como la gustativa, implica tipos de memoria de rango inferior dependientes de circuitos anatómicos independientes. En este trabajo se revisa la evidencia disponible sobre la neuroanatomía y funciones los circuitos neurales involucrados en ambos tipos de memoria de reconocimiento. Los datos indican la participación de núcleos talámicos, amígdala, corteza insular, corteza perirrinal e hipocampo en ambos tipos de memoria. La información sobre las características de las tareas que determinan el papel de estas zonas en la memoria de reconocimiento visual y gustativa permite establecer hipótesis acerca de sus funciones.*

*En conjunto, los conocimientos actuales dibujan un complejo circuito cerebral formado por el sistema hipocampal, la corteza perirrinal y áreas diencefálicas responsable de los diversos procesos necesarios para la memoria de reconocimiento. Los datos apoyan la existencia de mecanismos compartidos, aunque se requiere más investigación comparando ambos tipos de tareas para su identificación precisa.*

---

## **Contenidos**

1. Memoria de reconocimiento de objetos y gustativa: ¿dos tipos de memoria?
2. Neuroanatomía del sistema visual.
3. Neuroanatomía del sistema gustativo.
4. Coexistencia de funciones relacionadas con la memoria de reconocimiento visual y gustativa en los circuitos neurales.
  - 4.1. Tálamo
    - 4.1.1. Conectividad
    - 4.1.2. Participación en memoria de reconocimiento visual.
    - 4.1.3. Participación en memoria de reconocimiento gustativa.



- 4.2. Amígdala
    - 4.2.1. Conectividad
    - 4.2.2. Participación en memoria de reconocimiento visual.
    - 4.2.3. Participación en memoria de reconocimiento gustativa.
  - 4.3. Corteza Insular
    - 4.3.1. Conectividad
    - 4.3.2. Participación en memoria de reconocimiento visual.
    - 4.3.3. Participación en memoria de reconocimiento gustativa.
  - 4.4. Corteza Perirrinal
    - 4.4.1. Conectividad
    - 4.4.2. Participación en memoria de reconocimiento visual.
    - 4.4.3. Participación en memoria de reconocimiento gustativa.
  - 4.5. Hipocampo
    - 4.5.1. Conectividad
    - 4.5.2. Participación en memoria de reconocimiento visual.
    - 4.5.3. Participación en memoria de reconocimiento gustativa.
5. Conclusiones: hacia una aproximación de circuitos
- 

## **1. Memoria de reconocimiento de objetos y gustativa: ¿dos tipos de memoria?**

La memoria de reconocimiento es la habilidad para identificar como familiar un estímulo o situación experimentados previamente. Esta habilidad puede reflejarse en informes verbales o en modificaciones del comportamiento, lo que posibilita su estudio en modelos animales. Los conceptos de novedad y familiaridad juegan un papel relevante en las teorías del aprendizaje y la cognición en relación con los procesos atencionales. Los cambios en la atención dirigida a un estímulo o situación familiar versus la atención dirigida a uno novedoso dependen de su relación bien con consecuencias, ya sean aversivas o reforzantes, bien con la ausencia de consecuencias relevantes para el organismo. Por ello, cuando se trata de disociar en la medida de lo posible los procesos de aprendizaje y memoria, las tareas empleadas para investigar memoria de reconocimiento utilizan estímulos o situaciones sin consecuencias relevantes.

La memoria de reconocimiento puede explorarse empleando cualquier modalidad sensorial. Sin embargo, la modalidad estudiada paradigmáticamente en modelos animales ha sido la visual, empleando objetos (Véase Gómez-Chacón y Gallo en este volumen). Efectivamente, las tareas de memoria de reconocimiento de objetos, desarrolladas inicialmente en primates [82] y ampliamente utilizadas en roedores en la actualidad [41], son consideradas eminentemente visuales a pesar de que modificaciones de la tarea muestran que pueden participar otras modalidades sensoriales, tales como la somatosensorial o la olfativa (Albasser et al., 2011, 2012). Aunque existen interpretaciones alternativas, a raíz de las características generales de este tipo de memoria en seres humanos y primates la memoria de reconocimiento de objetos ha sido clasificada como memoria episódica, un tipo de memoria declarativa que permite recordar una vivencia o hecho concreto ocurrido previamente y que requiere la participación del lóbulo temporal medial [137].

Por el contrario, la memoria de reconocimiento gustativa se ha explorado típicamente en roedores presentando una solución gustativa en sesiones repetidas (Véase Gómez-Chacon y Gallo en este volumen). La novedad del sabor provoca una respuesta innata de cautela denominada neofobia gustativa [35], que consiste en un consumo inicial reducido con el objetivo de evitar potenciales efectos tóxicos. Si no se producen consecuencias negativas tras el consumo, la ingesta se incrementa en sucesivas presentaciones, a medida que es reconocido como familiar y seguro. Este proceso, denominado atenuación de la neofobia [35] se ha interpretado como un proceso de aprendizaje no asociativo correspondiente a un campo de estudio independiente de la memoria de reconocimiento hasta que Bermúdez-Rattoni lo propuso como modelo de memoria de reconocimiento [12]. Así, a pesar de que existe evidencia que puede posibilitar interpretaciones alternativas [46], la memoria de reconocimiento gustativa se clasifica como un tipo de memoria no declarativa independiente del hipocampo y áreas temporales asociadas.

En definitiva, en la actualidad se considera que las tareas de memoria de reconocimiento visual y gustativa reflejan las funciones de circuitos anatómicos

independientes y disociables que soportan tipos de memoria de distinto rango. El objetivo de este trabajo es revisar los conocimientos actuales acerca de la neuroanatomía e interacciones funcionales de los sistemas involucrados en ambos tipos de memoria. Es nuestra opinión que un mejor conocimiento acerca de la anatomía funcional de dichos sistemas neurales puede arrojar luz sobre la existencia de mecanismos compartidos y disociables, así como sobre la organización de los sistemas de memoria en general.

## **2. Neuroanatomía del sistema visual**

Los modelos animales empleados para estudiar el sistema visual han sido tradicionalmente el gato y primates como el macaco, debido a su similitud con el ser humano con respecto al tamaño de los ojos, la agudeza visual y la organización funcional de las vías visuales centrales. Efectivamente, la percepción visual en los roedores es de baja resolución espacial. Sin embargo, en la última década ha resurgido el interés por el estudio del sistema visual de estas especies en sí mismo y no sólo como modelo para el estudio del desarrollo y la plasticidad, principalmente en el ratón, debido al empleo de ratones transgénicos [56 para una revisión ].

Brevemente, la retina contiene fundamentalmente bastones y un porcentaje muy reducido de conos que expresan dos fotopigmentos. Uno de ellos es sensible a longitudes de onda corta de alrededor de 360 nm., que se corresponden con la luz ultravioleta y el otro es sensible a luz verde correspondiente a alrededor de 510 nm. Se trata, por tanto de visión dicromática similar a la de los gatos. Las células ganglionares, que forman el nervio óptico, al igual que en otras especies incluyendo el ser humano, contienen un tercer fotopigmento denominado melanopsina. Por otra parte, debido a la ausencia de fovea, la retina del roedor como la del gato, está dedicada a la visión periférica y escotópica siendo muy eficaz a pesar de las limitaciones impuestas por el tamaño del ojo.

El nervio óptico proyecta a más de 20 dianas subcorticales, incluyendo el colículo superior y el núcleo geniculado lateral dorsal, que proyecta al cortex

visual. Se ha propuesto que los colículos pueden mediar en roedores algunas de las funciones que únicamente dependen de la corteza visual en otras especies mamíferas, tales como el gato y primates. De este modo el roedor podría ocupar una posición evolutiva intermedia entre vertebrados no mamíferos con tectum óptico y mamíferos superiores [56]. Por su parte, el córtex visual primario (V1), a su vez, proyecta a áreas visuales extraestriadas, habiéndose identificado al menos nueve que reciben proyecciones directas en el ratón. Aunque la evidencia es escasa, las proyecciones sobre la corteza extraestriada sugieren la existencia de una disociación entre una vía ventral y otra dorsal, que podrían corresponderse con las descritas en otras especies, incluyendo el ser humano, especializadas en procesar que (ventral) y donde (dorsal). Una disociación similar se ha propuesto en el sistema somatosensorial de la rata, que recibe información táctil de las vibrisas, de manera que dicha información fuera utilizada en paralelo para identificar la forma del objeto (que) y sus coordenadas espaciales (donde), aunque se requiere más investigación en el tema [33].

En conjunto, la neurofisiología del sistema visual en ratas y ratones exhibe en los diversos relevos hasta la corteza visual características complejas con respuestas similares a las de mamíferos superiores junto a rasgos peculiares [47] especialmente indicados para una percepción precisa de la forma con baja resolución espacial.

### **3. Neuroanatomía del sistema gustativo.**

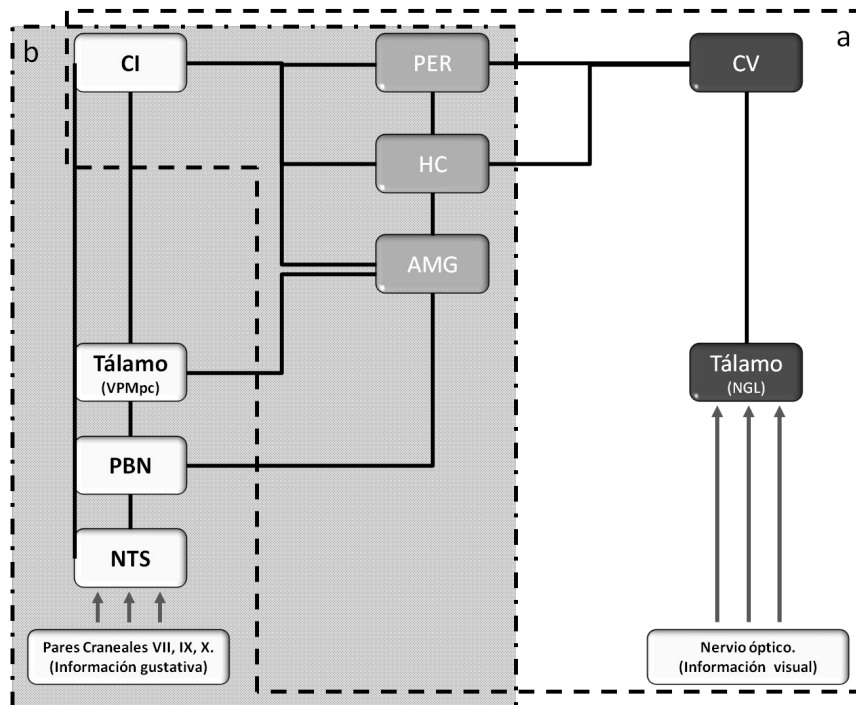
En los mamíferos, incluyendo los roedores y el ser humano, los receptores gustativos se encuentran en la cavidad oral, distribuidos en la lengua, parte posterior de la boca y faringe. Se disponen en grupos formando botones gustativos alrededor de las papilas gustativas. Las aferencias gustativas que proceden de estos receptores son transmitidas al sistema nervioso central a través de los pares craneales facial (VII), especialmente la corda timpánica, glossofaríngeo (IX), y vago (X) hasta alcanzar la parte rostral del núcleo del tracto solitario (NST) [141]. A su vez, en la rata éste proyecta ipsilateralmente hacia el

núcleo parabraquial (PBN) medial [106]. Ya en estos primeros relevos troncoencefálicos el sistema parece llevar a cabo el procesamiento dissociado de la cualidad gustativa y sus características hedónicas capaz de dirigir la conducta de ingestión, como demuestra el hecho de que ratas descerebradas muestren respuestas de aceptación y rechazo ante soluciones de distintos sabores administradas oralmente [51]. La información gustativa se distribuye a través de dos rutas o vías hacia la corteza gustativa situada en la corteza insular entre otras áreas cerebrales: una vía tálamo-cortical y una vía ventral [94,96,107,123]. La vía tálamo-cortical incluye proyecciones bilaterales hacia el área parvocelular del núcleo ventroposteromedial del tálamo (VPMpc), también denominada como tálamo gustativo, el cual mantiene conexiones con la zona gustativa de la corteza insular [94,107]. La vía ventral incluye proyecciones principalmente monosinápticas, y en la mayoría de los casos recíprocas, hacia la corteza gustativa, y amígdala. Además una gran variedad de áreas cerebrales implicadas en aprendizaje y memoria gustativa, así como el control de la conducta alimentaria reciben aferencias gustativas de forma directa o indirecta, como es el caso del núcleo de la base de la estría terminal (BNST), hipotálamo lateral, núcleo accumbens, corteza perirrinal y corteza prefrontal medial [98,141]. En conjunto, el sistema realiza un complejo procesamiento integrando la información acerca de la cualidad del estímulo con las consecuencias viscerales de su ingestión gracias a la convergencia de aferencias gustativas y viscerales en todos los niveles desde el primer relevo troncoencefálico en el NST hasta la corteza gustativa insular a través de las interacciones con la amígdala.

#### **4. Coexistencia de funciones relacionadas con la memoria de reconocimiento visual y gustativa en los circuitos neurales.**

A pesar de ocuparse de información correspondiente a modalidades sensoriales con sistemas sensoriales claramente dissociables la evidencia

neuroanatómica muestra la posibilidad de interacciones relevantes en los procesos de memoria de reconocimiento de objetos y gustativa dada la convergencia de información no sólo en áreas intermodales de nivel superior sino también en el circuito sensorial básico. Puede proponerse, por tanto, la existencia de mecanismos compartidos por ambos tipos de memoria. A continuación se revisan las principales áreas que han sido relacionadas con ambos tipos de memoria, haciendo hincapié en su organización anatómica y funcional (ver figura 1).



**Figura 1. Diagrama de las principales estructuras y conexiones implicadas en la memoria de reconocimiento visual y gustativa. a) circuito implicado en la memoria de reconocimiento visual. b) circuito implicado en la memoria de reconocimiento gustativa. NTS: núcleo del tracto solitario, PBN: núcleo parabraquial, VPMpc: área parvocelular del núcleo ventroposteromedial del tálamo, CI: corteza insular, AMG: amígdala, HC: hipocampo, PER: corteza perirrinal, NGL: núcleo geniculado lateral del tálamo, CV: corteza visual.**

#### 4.1. Tálamo

Los núcleos talámicos se han clasificado en función de su organización sináptica y conectividad en relevos de primer orden y relevos de orden superior.

Los núcleos que establecen relevos de primer orden envían la información sensorial recibida de relevos anteriores o de la periferia hacia la corteza. Este es el caso del núcleo geniculado lateral y el núcleo ventroposteromedial, relevos de la información visual, somatosensorial y gustativa. Por su parte, los núcleos de relevo de orden superior transmiten información entre áreas corticales. Entre ellos se encuentra el núcleo dorsomedial.

El área parvocelular del núcleo ventroposteromedial del tálamo (VPMpc), también conocido como tálamo gustativo, es una pequeña banda de células que se extiende hacia la zona medial desde el núcleo ventroposteromedial del tálamo (VPM). VPMpc contiene neuronas mecanoreceptoras en su parte medial, neuronas que responden a estímulos gustativos en su parte rostromedial y neuronas que responden a diversos estímulos relacionados con el sabor en su parte medial y caudal [95]. Ello le convierte en una de las estructuras más importantes para el procesamiento de la información gustativa, tanto sensorial como hedónica [71,115].

#### *4.1.1. Conectividad*

En roedores, VPMpc recibe fibras aferentes procedentes de PBN y envía conexiones hacia la corteza insular, constituyendo así un relevo ascendente de la información gustativa y somatosensorial [71,123]. Además, estudios con trazadores anterógrados y retrógrados arrojan evidencia de conexiones recíprocas entre los núcleos lateral y central de la amígdala con el tálamo gustativo [94,99,125,144], lo que demuestra la interconexión entre la vías ventral y talamo-cortical de procesamiento de información gustativa. En este sentido, se ha propuesto que estas conexiones transportan información sensorial gustativa, información hedónica apetitiva [115] así como información hedónica aversiva [143].

#### *4.1.2. Participación en memoria de reconocimiento visual.*

El daño conjunto de los cuerpos mamilares y del tálamo anterior deterioran la memoria de reconocimiento de objetos [127], a pesar de que la

lesión exclusivamente de los cuerpos mamilares o del tracto mamilotalámico [3,124], así como la de los núcleos anteriores del tálamo [48,84] y del núcleo dorsomedial del tálamo [83,84] no la afectan o solo provocan deterioros leves. A raíz de estos resultados se ha propuesto la participación de dos vías implicadas en este tipo de memoria con funciones especializadas en procesos diferentes [2]. En primer lugar la vía cuerpos mamilares-tálamo anterior-hipocampo participaría en el recuerdo y en segundo lugar la vía tálamo dorsomedial-cortezas parahipocampales-córtex prefrontal procesaría familiaridad (véase Gómez-Chacón y Gallo en este volumen para la descripción de estos procesos).

#### *4.1.3. Participación en memoria de reconocimiento gustativa.*

Se ha descrito que lesiones electrolíticas y excitotóxicas de VPMpc inducen una disminución en la respuesta neofóbica ante un estímulo gustativo [70], lo que sugiere un posible papel en los procesos implicados en la memoria de reconocimiento segura. Aunque existen discrepancias acerca de los efectos de lesiones talámicas en la adquisición de la memoria gustativa aversiva [50,114], existen informes que indican una marcada atenuación del aprendizaje gustativo aversivo en ratas lesionadas [66,142]. Por su parte, los escasos estudios que emplean marcaje de la proteína c-Fos muestran diferencias en la actividad de VPMpc ante la presentación de un sabor frente a la presentación de agua [89]. Esta activación se incrementa al presentar una solución novedosa (sacarina, 0,5%) frente a la presentación de la misma solución una vez reconocida como familiar después de seis exposiciones [68].

## **4.2. Amígdala**

Los núcleos de la amígdala están organizados en tres regiones principales: un grupo centromedial, incluyendo núcleos central y medial; un grupo cortical o superficial; y un grupo basolateral, incluyendo el núcleo basal, lateral y núcleos basales accesorios [8,77,98,111].



#### 4.2.1. *Conectividad*

Los datos sobre proyecciones aferentes y eferentes de los núcleos de la amígdala provienen principalmente de estudios con trazadores anterógrados y retrógrados inyectados en diversas regiones corticales y subcorticales. Estos estudios revelan que cada núcleo amigdalino recibe entradas de múltiples regiones del cerebro y de la misma manera sus proyecciones eferentes son también generalizadas, incluyendo tanto regiones corticales como subcorticales [revisado en 77,104,111].

De especial relevancia para la memoria de reconocimiento cabe señalar, además de las ya mencionadas conexiones entre la amígdala y el tálamo gustativo, las conexiones recíprocas entre los núcleos de la amígdala y el hipotálamo lateral, la corteza insular, la corteza perirrinal y el hipocampo [94,111,123].

#### 4.2.2. *Participación en memoria de reconocimiento visual.*

El papel de la amígdala en memoria de reconocimiento visual no está bien definido, sin embargo, estudios recientes muestran que la formación de la memoria durante el entrenamiento en la tarea básica de reconocimiento de objetos (SOR), bajo unas condiciones experimentales específicas, puede verse afectada por la modulación de la actividad noradrenérgica en la amígdala basolateral [110]. Además, infusiones en la amígdala basolateral de rapamicina, un inhibidor de mTOR (mammalian target of rapamycin, una serina/treonina quinasa implicada en la regulación del crecimiento celular y la progresión el ciclo celular mediante la integración de señales de factores de crecimiento) administrada tanto antes como después del entrenamiento deteriora la retención a las 24h en la tarea SOR, [57], lo que apoya la participación de la amígdala basolateral en la formación de la memoria de reconocimiento visual.

#### 4.2.3. *Participación en memoria de reconocimiento gustativa.*

La amígdala está activamente involucrada en el procesamiento emocional y tiene un papel importante en la formación de la memoria aversiva, incluyendo

la adquisición y el almacenamiento de los recuerdos de miedo condicionado y la tarea de evitación inhibitoria [76,98]. Al mismo tiempo, la amígdala parece desempeñar un papel relevante en la memoria de reconocimiento gustativa. Por un lado, tanto lesiones electrolíticas como excitotóxicas del núcleo basolateral de la amígdala (BLA) reducen la respuesta neofóbica ante sabores desconocidos [60,65,69,93,108]. Por otro lado, el bloqueo de receptores NMDA en dicho núcleo mediante la infusión de MK-801 (antagonista no competitivo de los receptores NMDA) impide la atenuación de la respuesta neofóbica [43], imposibilitando así la formación de memorias gustativas seguras. Sea cual sea la fase afectada, en cualquier caso la integridad de BLA parece necesaria para la memoria de reconocimiento gustativo. Además, estudios mediante el marcaje de la proteína C-Fos muestran un aumento significativo de la actividad neuronal ante la presentación de un estímulo gustativo novedoso en el núcleo central y en el núcleo basolateral de la amígdala [64,68,86,132].

### **4.3. Corteza insular**

La corteza insular contiene tres subdivisiones que se pueden identificar en el plano dorso-ventral: la subdivisión granular (dorsal), la disgranular (intermedio) y la agranular (ventral) [62,72]. Esta nomenclatura refleja la desaparición progresiva de la capa granular (es decir, la capa IV) y un cambio en la organización laminar. La capa IV está presente en la corteza insular granular (estructura en seis capas), dismórfica en la corteza insular disgranular (capa IV más delgada) y ausente en la agranular (sin capa IV, fusión entre capas V y VI). En roedores, la corteza gustativa, definida a través de las proyecciones desde VPMpc, ocupa la zona anterior de la corteza insular granular y disgranular [116].

#### *4.3.1. Conectividad*

Por un lado, a través de la vía tálamo-cortical, la corteza gustativa recibe información relacionada con el sabor principalmente desde el tálamo gustativo, con el cual mantiene conexiones recíprocas, aunque además envía axones descendentes directamente al primer y segundo nivel de relevo

troncoencefálicos situados en el núcleo del tracto solitario y núcleo parabraquial, respectivamente [67,71]. Por otro lado, en la vía ventral, la corteza gustativa mantiene conexiones recíprocas con la amígdala y el hipotálamo lateral, los cuales envían a su vez proyecciones descendentes hacia el núcleo del tracto solitario y el núcleo parabraquial [71,94,96,126].

Además, la corteza gustativa mantiene conexiones recíprocas con la corteza prefrontal medial [55,98,141], el núcleo accumbens [98,140,141], con el hipocampo [29] y con la corteza perirrinal [59,116].

#### *4.3.2. Participación en memoria de reconocimiento visual.*

A pesar de que la mayor parte de la investigación se ha centrado en explorar la participación de la corteza insular en la memoria de reconocimiento gustativa, existe evidencia que sugiere un papel más general de la zona en la consolidación de la memoria. De hecho infusiones del antagonista muscarínico escopolamina en la corteza insular de ratas inmediatamente después de la adquisición deterioraron la memoria en una tarea SOR [13], lo que apoya la relevancia de la transmisión colinérgica en la corteza insular en la memoria de reconocimiento de objetos.

#### *4.3.3. Participación en memoria de reconocimiento gustativa.*

Se ha sugerido que la corteza insular participa en las reacciones a la novedad y la saliencia de los estímulos gustativos, así como en la memoria del sabor (Bures and Gallo, 1990) pudiendo modular de este modo la adquisición y retención de aversiones gustativas condicionadas [36]. Efectivamente, lesiones farmacológicas permanentes y transitorias han demostrado que la corteza insular tiene un papel relevante en la formación de la memoria de reconocimiento gustativa, afectando al establecimiento del condicionamiento aversivo gustativo [53,69,119,142], así como impidiendo la atenuación de la neofobia gustativa [42].

Estos resultados sugieren que una corteza insular intacta es esencial tanto para la persistencia de la huella de memoria, como para su recuperación. Congruentemente, la presentación de un sabor novedoso produce un incremento

en la expresión de la proteína C-Fos en la zona en comparación con el efecto de la presentación de un sabor familiar [64,68]. De la misma forma, el condicionamiento aversivo gustativo de un sabor novedoso produce un aumento de la expresión de C-Fos con respecto al condicionamiento que emplea un sabor familiar [63]

#### **4.4. Corteza perirrinal**

La corteza perirrinal (PER) se considera, junto con la corteza entorrinal y postrinal, parte integral de la formación parahipocampal por lo que su papel es fundamental en el procesamiento de información dentro y fuera de la región del hipocampo. En la rata, PER está localizada a lo largo del surco rinal y está compuesta por las áreas 35 y 36 de Brodmann, lindando rostralmente con la corteza insular y el área visceral, caudalmente con el córtex postrinal, dorsalmente con la corteza de asociación temporal ventral y ventralmente con el córtex entorrinal lateral [21,24,59].

##### *4.4.1. Conectividad*

La corteza perirrinal mantiene conexiones recíprocas con diferentes áreas subcorticales tales como la amígdala, núcleos de la línea media del tálamo, hipotálamo, ganglios basales, núcleo de raphé, y bulbo olfatorio [80,111]. En cuanto a las aferencias corticales, PER recibe proyecciones desde la corteza precentral, cingulada, parietal, frontal, piriforme, insular, prelimbica, infralímbica, periamigdalina, y cortezas asociativas visual y auditiva. [59,73,116]. Además, dentro de la formación parahipocampal, PER mantiene conexiones con la corteza entorrinal, postrinal y el área CA1 del hipocampo [29,59,138].

De especial relevancia para la memoria de reconocimiento son las conexiones bidireccionales con la corteza frontal, insular, parietal y visual [22].

Aunque el córtex perirrinal tiene algunas conexiones con la corteza visual primaria son especialmente las zonas de asociación visual secundaria las que muestran un mayor número de proyecciones [4,100]. Con respecto a las aferencias subcorticales PER recibe proyecciones de la amígdala, el tálamo y el

hipotálamo, entre otras zonas [102,103]. Desde la amígdala las principales proyecciones parten de los núcleos del tracto olfatorio lateral, el accesorio basal, y de los núcleos basal y lateral [45,102]. A su vez la corteza perirrinal envía eferencias a los núcleos lateral, basolateral y basomedial de la amígdala [103]. Dentro del tálamo tanto núcleos de la zona ventral como dorsal, así como los núcleos reuniens y romboides de la línea media, mandan proyecciones hacia la corteza perirrinal [128].

Además, son de especial importancia las conexiones dentro del sistema parahipocámpal. Así existen conexiones recíprocas con CA1, subiculum y las cortezas entorrinal y postrinal [23,61]. A través de estas proyecciones, PER mantiene conexiones indirectas con los núcleos más importantes del sistema hipocámpal (giro dentado y CA3) [para una visión más completa de las conexiones de la corteza perirrinal véase 59]

#### *4.4.2. Participación en memoria de reconocimiento visual.*

El papel relevante de PER en las tareas de reconocimiento visual es ampliamente aceptado. Los estudios de lesión lo han confirmado tanto en monos, empleando tareas de desigualación a la muestra demorada [9,17,18,74] como en roedores, principalmente con tareas SOR [25,38,40,130,134], aunque también se ha relacionado la zona con tareas de miedo condicionado [121] y espaciales [1]. Efectivamente, la corteza perirrinal ha sido relacionada principalmente con el reconocimiento de objetos [como ejemplo véase 6,16,40,92,97,131,133]. Sin embargo, existe un intenso debate sobre el tipo de procesamiento que lleva a cabo y su relación con otras áreas, tales como el hipocampo.

En este sentido numerosos estudios han demostrado un incremento en la actividad de PER ante un objeto nuevo, frente a un objeto familiar, lo que apoyaría un papel en la detección de la novedad del objeto [7,16,129,148,149].

Sin embargo existe una variedad de tareas y procesos en la memoria de reconocimiento visual en las que el papel de PER no parece fundamental. Un ejemplo son las tareas de reconocimiento espacial de objetos [34], tareas que

siguen la misma lógica que la de SOR pero en las que se altera la localización espacial de los objetos previamente presentados. Las tareas con componentes espaciales no resultan afectadas por la lesión de esta estructura [130].

#### *4.4.3. Participación en memoria de reconocimiento gustativa.*

Aunque escasa, la investigación sobre la implicación de la corteza perirrinal en la formación de la memoria de reconocimiento gustativa muestra como la inactivación temporal de la corteza perirrinal aplicando inyecciones locales de anisomicina, inhibidor de la síntesis proteica, puede impedir la habituación de la neofobia gustativa [32]. Asimismo, microinyecciones bilaterales de escopolamina, antagonista de los receptores muscarínicos colinérgicos, en PER impiden la formación de la memoria gustativa segura si se aplican inmediatamente después de la ingestión de una solución novedosa [52]. Por otro lado, el único trabajo que ha evaluado la activación de PER en relación con la memoria de reconocimiento gustativa segura mediante técnicas inmunohistoquímicas informa de que la ingestión de una solución gustativa familiar incrementa la actividad de c-Fos en la zona medial de PER en comparación con el consumo de la misma solución durante la primera presentación [49]. Estos resultados resultan contradictorios con estudios similares empleando reconocimiento de objetos y plantean cuestiones relevantes acerca de la importancia de la zona en la detección de la novedad o de la familiaridad de la situación (pero véase una interpretación alternativa en Gómez-Chacón y Gallo en este volumen). Además, el bloqueo de la formación de la memoria gustativa segura mediante lesiones de la amígdala basolateral anuló la activación diferencial inducida por la familiaridad del sabor en PER.

### **4.5. Hipocampo**

La amnesia del paciente HM tras la extirpación de gran parte de su sistema hipocampal fue el germen de la investigación posterior que asoció los procesos de memoria con la función del sistema hipocampal. El hipocampo está principalmente formada por el giro dentado, las zonas CA1, CA2 y CA3 y el

subículo. Estas estructuras están organizadas en gran medida, de manera unidireccional de forma que el flujo de información sigue la dirección giro dentado, CA3, CA1 y subículo. El hipocampo tiene amplias proyecciones con el sistema parahipocampal, siendo el cortex entorrinal la principal fuente de aferencias y eferencias del hipocampo.

#### *4.5.1. Conectividad*

El subículo mantiene importantes conexiones bidireccionales con el córtex entorrinal (medial y lateral) y las cortezas peririnal y postrinal [59]. Por un lado, el hipocampo tiene importantes conexiones con el córtex prefrontal tanto directas [revisadas en 28,122], como indirectas a través de la cortezas peririnal, entorrinal lateral y de estructuras talámicas como el núcleo dorsolateral [24,130], núcleo talámico anterior, y los núcleos intralaminares y de la línea media, [para una revisión más completa véase 2]. De igual manera el hipocampo está conectado con los cuerpos mamilares a través del fornix [112].

#### *4.5.2. Participación en memoria de reconocimiento visual.*

Existe acuerdo a raíz de la evidencia obtenida tanto en estudios de lesión como de registro de la actividad sobre la implicación del hipocampo en la memoria de reconocimiento visual cuando se emplean tareas que incluyen información espacial [101,109,129]. La integridad del hipocampo también ha demostrado ser esencial cuando la memoria de reconocimiento exige establecer asociaciones entre configuraciones complejas de múltiples estímulos y se tiene que manejar esta información [39, véase esta revisión donde se destaca el papel integrador de información del hipocampo ,54].

Sin embargo, la lesión del hipocampo no parece afectar, o solamente producir leve deterioro, en la ejecución de las tareas de reconocimiento de objetos cuando éstas utilizan uno o pocos estímulos y la información espacial no es relevante [87,136]. Ello se ha descrito tanto con tareas de desigualación a la muestra demorada [37,91], como en tareas de SOR [44,88,136].

Estos datos han sido interpretados como una prueba de las teorías duales

de la memoria de reconocimiento visual. Se propone que el sistema hipocampal jugaría un papel esencial en los procesos de recuerdo, mientras que la corteza perirrinal se encargaría del procesamiento de la familiaridad de los objetos. De esta manera ambos procesos serían independientes y disociables [16,147].

Sin embargo es necesario destacar que existen modelos explicativos alternativos que se centran en la fortaleza o debilidad de los recuerdos, como sustitutos de los conceptos de familiaridad y recuerdo, para explicar los distintos procesos implicados en la memoria de reconocimiento [117,118,139] De este forma, otras posiciones defienden que, aunque con algunas diferencias funcionales, tanto el sistema hipocampal como la corteza perirrinal pueden intervenir en los procesos de familiaridad y recuerdo [31]. Según esta propuesta que los recuerdos “fuertes” requieren la actividad hipocampal, ya sean relacionados con una alta familiaridad o alto recuerdo o ambos, mientras que el córtex perirrinal estaría más implicado en la detección de la novedad y familiaridad [118].

#### *4.5.3. Participación en memoria de reconocimiento gustativa.*

Aunque estudios tempranos informaron de la participación del hipocampo en la memoria gustativa aversiva (Reilly et al. 1993), su papel parece ponerse de manifiesto únicamente en tareas que involucran relaciones complejas entre estímulos y efectos del contexto tanto espacial sin que su integridad sea necesaria para la adquisición y mantenimiento de aversiones gustativas condicionadas [véase 46 para una revisión]. Por el contrario, se ha informado de que la inactivación temporal del hipocampo dorsal puede incluso mejorar la consolidación de este tipo de memoria [120].

Con respecto a la memoria de reconocimiento gustativa se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo deteriora la habituación de la neofobia gustativa, sin afectar a la memoria gustativa aversiva [32].

En el mismo sentido, se ha descrito un aumento de la activación del gen CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP $\beta$ ) en el hipocampo al presentar un



sabor novedoso (sacarina 0,1%) frente a la exposición de agua; además, la activación de C/EBP $\beta$  aumentó 18 horas después de la exposición al sabor [145]. Por otro lado, se ha informado de la participación crucial del hipocampo en el efecto de la memoria gustativa segura en el aprendizaje posterior, fenómeno denominado inhibición latente, siempre y cuando se introduzcan cambios del contexto temporal. Así, la lesión del hipocampo en ratas adultas elimina la dependencia del contexto que muestra este efecto [85] y facilita la aversión gustativa dependiente del contexto en ratas envejecidas [75]. En conjunto, los resultados apoyan un papel modulador del hipocampo sobre la memoria de reconocimiento gustativa, cuya relevancia depende de la tarea empleada.

## **5. Conclusión: hacia una aproximación de circuitos.**

Aunque la estructura de esta revisión está organizada en torno a áreas cerebrales individuales, la evidencia experimental que contiene pone de manifiesto que la comprensión de los mecanismos cerebrales implicados en la memoria de reconocimiento requiere una aproximación de circuitos. Los conocimientos actuales dibujan un complejo circuito cerebral formado por el sistema hipocampal, la corteza perirrinal y áreas diencefálicas responsable de los diversos procesos necesarios para la memoria de reconocimiento.

En este sentido se ha destacado el papel de PER en procesos perceptivos complejos, que permiten integrar diversos rasgos visuales o cuando existe superposición de características entre los objetos a discriminar o reconocer, lo que aumenta la ambigüedad de la tarea [10,19]. Se ha propuesto, así, un modelo perceptual-mnésico de la actividad del PER, donde se integran ambas funciones [26,27,90]. Según esta propuesta PER cumple una función de puerta de entrada de la información sensorial hacia el hipocampo [138]. Así, PER actuaría como un área de asociación de la información sensorial y de la información emocional procedente de la amígdala [58] Más allá de mera estación de relevo, se le atribuyen importantes funciones perceptivas y mnemotécnicas jugando un posible papel en el procesamiento perceptivo a alto nivel [26,27,90]

Comprender la importancia de las interacciones entre áreas cerebrales con funciones disociables implicadas en memoria de reconocimiento puede resolver debates de larga tradición en el campo. Ya desde los primeros años de la investigación sobre la neuroanatomía de la memoria de reconocimiento en modelos animales no hubo acuerdo sobre las estructuras cerebrales implicadas. Aunque las propuestas iniciales se centraban en el papel del hipocampo y la amígdala en el reconocimiento de objetos [14,30,81,113,150,151], en la actualidad se ha acumulado un número creciente de estudios que destacan la corteza perirral como estructura fundamental [11,20,40,74,79,105,131,134-136]. Los modelos teóricos duales para explicar la memoria de reconocimiento han permitido integrar ambos tipos de resultados. Así Yonelinas [146] propone que los juicios de reconocimiento pueden basarse en la evaluación de la familiaridad o en un proceso consciente de recuerdo. Hipocampo y PER contribuirían a estos dos procesos de manera independiente. Actualmente los modelos duales están cobrando relevancia a la hora de explicar los circuitos cerebrales implicados en la memoria de reconocimiento de objetos [2,5,15,16,147].

Además de los circuitos hipocampo-corticales es de destacar la importancia de la interacción con áreas subcorticales. El diencefalo está ampliamente conectado con las cortezas parahipocampales, el hipocampo y la corteza prefrontal. La evidencia apoya la participación de estructuras diencefálicas [para una revisión en profundidad véase 2] y troncoencefálicas [78] en circuitos implicados en la memoria de reconocimiento.

Una última cuestión radica en la posibilidad de establecer circuitos neuroanatómicos compartidos por la memoria de reconocimiento visual y gustativa. La evidencia revisada apoya este planteamiento, aunque se requiere más investigación para identificar el modo en que se integran mecanismos compartidos y disociables y la naturaleza de los circuitos involucrados.

## **Referencias**

1. Abe H, Ishida Y, Nonaka H, Iwasaki T. Functional difference between rat perirhinal cortex and hippocampus in object and place discrimination tasks. *Behav Brain Res* 2009;197(2):388-97.
2. Aggleton JP, Dumont JR, Warburton EC. Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: a review. *Learn Mem* 2011;18(6):384-400.
3. Aggleton JP, Neave N, Nagle S, Hunt PR. A comparison of the effects of anterior thalamic, mamillary body and fornix lesions on reinforced spatial alternation. *Behav Brain Res* 1995;68(1):91-101.
4. Agster KL, Burwell RD. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus* 2009;19(12):1159-86.
5. Albasser MM, Amin E, Iordanova MD, Brown MW, Pearce JM, Aggleton JP. Separate but interacting recognition memory systems for different senses: The role of the rat perirhinal cortex. *Learn Mem* 2011;18(7):435-43.
6. Albasser MM, Davies M, Futter JE, Aggleton JP. Magnitude of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: Effects of varying the lesion extent and the duration of the sample period. *Behav Neurosci* 2009;123(1):115-24.
7. Albasser MM, Poirier GL, Aggleton JP. Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *Eur J Neurosci* 2010;31(1):134-47.
8. Alheid GF. Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 2003;985:185-205.
9. Alvarado MC, Bachevalier J. Comparison of the effects of damage to the perirhinal and parahippocampal cortex on transverse patterning and location memory in rhesus macaques. *J Neurosci* 2005;25(6):1599-609.
10. Barense MD, Henson RN, Graham KS. Perception and conception: temporal lobe activity during complex discriminations of familiar and novel faces and objects. *J Cogn Neurosci* 2011;23(10):3052-67.
11. Baxter MG, Murray EA. Impairments in visual discrimination learning and recognition memory produced by neurotoxic lesions of rhinal cortex in rhesus monkeys. *Eur J Neurosci* 2001;13(6):1228-38.
12. Bermudez-Rattoni F. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 2004;5(3):209-17.
13. Bermudez-Rattoni F, Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 2005;12(5):447-9.
14. Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(40):14515-20.

15. Brown MW, Aggleton JP. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2001;2(1):51-61.
16. Brown MW, Warburton EC, Aggleton JP. Recognition memory: material, processes, and substrates. *Hippocampus* 2010;20(11):1228-44.
17. Buffalo EA, Ramus SJ, Clark RE, Teng E, Squire LR, Zola SM. Dissociation between the effects of damage to perirhinal cortex and area TE. *Learn Mem* 1999;6(6):572-99.
18. Buffalo EA, Ramus SJ, Squire LR, Zola SM. Perception and recognition memory in monkeys following lesions of area TE and perirhinal cortex. *Learn Mem* 2000;7(6):375-82.
19. Burke SN, Wallace JL, Hartzell AL, Nematollahi S, Plange K, Barnes CA. Age-associated deficits in pattern separation functions of the perirhinal cortex: a cross-species consensus. *Behav Neurosci* 2011;125(6):836-47.
20. Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, Uprety AR, Barnes CA. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci* 2010;124(5):559-73.
21. Burwell RD. Borders and cytoarchitecture of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *J Comp Neurol* 2001;437(1):17-41.
22. Burwell RD, Amaral DG. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 1998;398(2):179-205.
23. Burwell RD, Amaral DG. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 1998;391(3):293-321.
24. Burwell RD, Witter MP, Amaral DG. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 1995;5(5):390-408.
25. Bussey TJ, Duck J, Muir JL, Aggleton JP. Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behav Brain Res* 2000;111(1-2):187-202.
26. Bussey TJ, Saksida LM, Murray EA. Impairments in visual discrimination after perirhinal cortex lesions: testing 'declarative' vs. 'perceptual-mnemonic' views of perirhinal cortex function. *Eur J Neurosci* 2003;17(3):649-60.
27. Bussey TJ, Saksida LM, Murray EA. The perceptual-mnemonic/feature conjunction model of perirhinal cortex function. *Q J Exp Psychol B* 2005;58(3-4):269-82.
28. Cavada C, Company T, Tejedor J, Cruz-Rizzolo RJ, Reinoso-Suarez F. The anatomical connections of the macaque monkey orbitofrontal cortex. A review. *Cereb Cortex* 2000;10(3):220-42.
29. Cenquizca LA, Swanson LW. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev*

- 2007;56(1):1-26.
30. Clark RE, Zola SM, Squire LR. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 2000;20(23):8853-60.
  31. Cowell RA, Bussey TJ, Saksida LM. Components of recognition memory: dissociable cognitive processes or just differences in representational complexity? *Hippocampus* 2010;20(11):1245-62.
  32. De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermudez-Rattoni F. Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur J Neurosci* 2008;28(7):1377-81.
  33. Diamond ME, von Heimendahl M, Knutsen PM, Kleinfeld D, Ahissar E. 'Where' and 'what' in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci* 2008;9(8):601-12.
  34. Dix SL, Aggleton JP. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res* 1999;99(2):191-200.
  35. Domjan M, Gillan D. Role of novelty in the aversion for increasingly concentrated saccharin solutions. *Physiol Behav* 1976;16(5):537-42.
  36. Dunn LT, Everitt BJ. Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behav Neurosci* 1988;102(1):3-23.
  37. Duva CA, Floresco SB, Wunderlich GR, Lao TL, Pinel JP, Phillips AG. Disruption of spatial but not object-recognition memory by neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus in rats. *Behav Neurosci* 1997;111(6):1184-96.
  38. Eacott MJ, Machin PE, Gaffan EA. Elemental and configural visual discrimination learning following lesions to perirhinal cortex in the rat. *Behav Brain Res* 2001;124(1):55-70.
  39. Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* 2000;1(1):41-50.
  40. Ennaceur A, Aggleton JP. The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behav Brain Res* 1997;88(2):181-93.
  41. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988;31(1):47-59.
  42. Figueroa-Guzman Y, Kuo JS, Reilly S. NMDA receptor antagonist MK-801 infused into the insular cortex prevents the attenuation of gustatory neophobia in rats. *Brain Res* 2006;1114(1):183-6.
  43. Figueroa-Guzman Y, Reilly S. NMDA receptors in the basolateral amygdala and gustatory neophobia. *Brain Res* 2008;1210:200-3.
  44. Forwood SE, Winters BD, Bussey TJ. Hippocampal lesions that abolish

- spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus* 2005;15(3):347-55.
45. Furtak SC, Wei SM, Agster KL, Burwell RD. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus* 2007;17(9):709-22.
  46. Gallo M, Ballesteros MA, Molero A, Morón I. Taste aversion learning as a tool for the study of hippocampal and non-hippocampal brain memory circuits regulating diet selection. *Nutr Neurosci* 1999;2:277-302.
  47. Girman SV, Sauve Y, Lund RD. Receptive field properties of single neurons in rat primary visual cortex. *J Neurophysiol* 1999;82(1):301-11.
  48. Gold JJ, Squire LR. The anatomy of amnesia: neurohistological analysis of three new cases. *Learn Mem* 2006;13(6):699-710.
  49. Gomez-Chacon B, Gamiz F, Gallo M. Basolateral amygdala lesions attenuate safe taste memory-related c-fos expression in the rat perirhinal cortex. *Behav Brain Res* 2012;230(2):418-22.
  50. Grigson PS, Lyuboslavsky P, Tanase D. Bilateral lesions of the gustatory thalamus disrupt morphine- but not LiCl-induced intake suppression in rats: evidence against the conditioned taste aversion hypothesis. *Brain Res* 2000;858(2):327-37.
  51. Grill HJ, Norgren R. The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Res* 1978;143(2):281-97.
  52. Gutierrez R, De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F. Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learn Mem* 2004;11(1):95-101.
  53. Gutierrez R, Tellez LA, Bermudez-Rattoni F. Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci* 2003;17(8):1556-62.
  54. Honey RC, Watt A, Good M. Hippocampal lesions disrupt an associative mismatch process. *J Neurosci* 1998;18(6):2226-30.
  55. Hoover WB, Vertes RP. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 2007;212(2):149-79.
  56. Huberman AD, Niell CM. What can mice tell us about how vision works? *Trends Neurosci* 2011;34(9):464-73.
  57. Jobim PF, Pedroso TR, Werenicz A, Christoff RR, Maurmann N, Reolon GK, Schroder N, Roesler R. Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. *Behav Brain Res* 2012;228(1):151-8.
  58. Kajiwara R, Takashima I, Mimura Y, Witter MP, Iijima T. Amygdala input promotes spread of excitatory neural activity from perirhinal cortex to the entorhinal-hippocampal circuit. *J Neurophysiol* 2003;89(4):2176-84.

59. Kealy J, Commins S. The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Prog Neurobiol* 2011;93(4):522-48.
60. Kesner RP, Berman RF, Tardif R. Place and taste aversion learning: role of basal forebrain, parietal cortex, and amygdala. *Brain Res Bull* 1992;29(3-4):345-53.
61. Kloosterman F, van Haeften T, Lopes da Silva FH. Two reentrant pathways in the hippocampal-entorhinal system. *Hippocampus* 2004;14(8):1026-39.
62. Kobayashi M. Macroscopic connection of rat insular cortex: anatomical bases underlying its physiological functions. *Int Rev Neurobiol* 2011;97:285-303.
63. Koh MT, Bernstein IL. Mapping conditioned taste aversion associations using c-Fos reveals a dynamic role for insular cortex. *Behav Neurosci* 2005;119(2):388-98.
64. Koh MT, Wilkins EE, Bernstein IL. Novel tastes elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: implication for taste aversion learning. *Behav Neurosci* 2003;117(6):1416-22.
65. Kolakowska L, Larue-Achagiotis C, Le Magnen J. Comparative effects of lesion of the basolateral nucleus and lateral nucleus of the amygdaloid body on neophobia and conditioned taste aversion in the rat. *Physiol Behav* 1984;32(4):647-51.
66. Lasiter PS. Thalamocortical relations in taste aversion learning: II. Involvement of the medial ventrobasal thalamic complex in taste aversion learning. *Behav Neurosci* 1985;99(3):477-95.
67. Lasiter PS, Glanzman DL, Mensah PA. Direct connectivity between pontine taste areas and gustatory neocortex in rat. *Brain Res* 1982;234(1):111-21.
68. Lin JY, Roman C, Arthurs J, Reilly S. Taste neophobia and c-Fos expression in the rat brain. *Brain Res* 2012;1448:82-8.
69. Lin JY, Roman C, St Andre J, Reilly S. Taste, olfactory and trigeminal neophobia in rats with forebrain lesions. *Brain Res* 2009;1251:195-203.
70. Loullis CC, Wayner MJ, Jolicoeur FB. Thalamic taste nuclei lesions and taste aversion. *Physiol Behav* 1978;20(5):653-5.
71. Lundy Jr RF, Norgren R, George P. Chapter 28 - Gustatory System. *The Rat Nervous System (Third Edition)*. Burlington: Academic Press; 2004. p 891-921.
72. Maffei A, Haley M, Fontanini A. Neural processing of gustatory information in insular circuits. *Curr Opin Neurobiol* 2012;22(4):709-16.
73. Majak K, Pitkanen A. Projections from the periamygdaloid cortex to the amygdaloid complex, the hippocampal formation, and the parahippocampal region: a PHA-L study in the rat. *Hippocampus* 2003;13(8):922-42.
74. Malkova L, Bachevalier J, Mishkin M, Saunders RC. Neurotoxic lesions of perirhinal cortex impair visual recognition memory in rhesus monkeys.

- Neuroreport 2001;12(9):1913-7.
75. Manrique T, Moron I, Ballesteros MA, Guerrero RM, Fenton AA, Gallo M. Hippocampus, aging, and segregating memories. *Hippocampus* 2009;19(1):57-65.
  76. Maren S. Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol Neurobiol* 1996;13(1):1-22.
  77. McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 1998;55(3):257-332.
  78. Mello-Carpes PB, Izquierdo I. The Nucleus of the Solitary Tract-->Nucleus Paragigantocellularis-->Locus Coeruleus-->CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 2013;100:56-63.
  79. Meunier M, Bachevalier J, Mishkin M, Murray EA. Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. *J Neurosci* 1993;13(12):5418-32.
  80. Mickley GA, Kenmuir CL, Yocom AM, Wellman JA, Biada JM. A role for prefrontal cortex in the extinction of a conditioned taste aversion. *Brain Res* 2005;1051(1-2):176-82.
  81. Mishkin M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* 1978;273(5660):297-8.
  82. Mishkin M, Delacour J. An analysis of short-term visual memory in the monkey. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 1975;1(4):326-34.
  83. Mitchell AS, Browning PG, Baxter MG. Neurotoxic lesions of the medial mediodorsal nucleus of the thalamus disrupt reinforcer devaluation effects in rhesus monkeys. *J Neurosci* 2007;27(42):11289-95.
  84. Mitchell AS, Dalrymple-Alford JC. Dissociable memory effects after medial thalamus lesions in the rat. *Eur J Neurosci* 2005;22(4):973-85.
  85. Molero A, Moron I, Angeles Ballesteros M, Manrique T, Fenton A, Gallo M. Hippocampus, temporal context and taste memories. *Chem Senses* 2005;30 Suppl 1:i160-1.
  86. Montag-Sallaz M, Welzl H, Kuhl D, Montag D, Schachner M. Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain. *J Neurobiol* 1999;38(2):234-46.
  87. Mumby DG. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav Brain Res* 2001;127(1-2):159-81.
  88. Mumby DG, Tremblay A, Lecluse V, Lehmann H. Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Hippocampus* 2005;15(8):1050-6.
  89. Mungarndee SS, Lundy RF, Jr., Norgren R. Expression of Fos during sham



- sucrose intake in rats with central gustatory lesions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295(3):R751-63.
90. Murray EA, Bussey TJ. Perceptual-mnemonic functions of the perirhinal cortex. *Trends Cogn Sci* 1999;3(4):142-51.
  91. Murray EA, Mishkin M. Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *J Neurosci* 1998;18(16):6568-82.
  92. Murray EA, Richmond BJ. Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11(2):188-93.
  93. Nachman M, Ashe JH. Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions, and sodium appetite in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1974;87(4):622-43.
  94. Nakashima M, Uemura M, Yasui K, Ozaki HS, Tabata S, Taen A. An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. *Neurosci Res* 2000;36(4):297-309.
  95. Nomura T, Ogawa H. The taste and mechanical response properties of neurons in the parvicellular part of the thalamic posteromedial ventral nucleus of the rat. *Neurosci Res* 1985;3(2):91-105.
  96. Norgren R. Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J Comp Neurol* 1976;166(1):17-30.
  97. Norman G, Eacott MJ. Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. *Behav Brain Res* 2004;148(1-2):79-91.
  98. Nunez-Jaramillo L, Ramirez-Lugo L, Herrera-Morales W, Miranda MI. Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behav Brain Res* 2010;207(2):232-48.
  99. Ottersen OP, Ben-Ari Y. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. I. Projections from the thalamus. *J Comp Neurol* 1979;187(2):401-24.
  100. Paperna T, Malach R. Patterns of sensory intermodality relationships in the cerebral cortex of the rat. *J Comp Neurol* 1991;308(3):432-56.
  101. Parkinson JK, Murray EA, Mishkin M. A selective mnemonic role for the hippocampus in monkeys: memory for the location of objects. *J Neurosci* 1988;8(11):4159-67.
  102. Pikkarainen M, Pitkanen A. Projections from the lateral, basal and accessory basal nuclei of the amygdala to the perirhinal and postrhinal cortices in rat. *Cereb Cortex* 2001;11(11):1064-82.
  103. Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex,

- and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 2000;911:369-91.
104. Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 1997;20(11):517-23.
  105. Ranganath C, Yonelinas AP, Cohen MX, Dy CJ, Tom SM, D'Esposito M. Dissociable correlates of recollection and familiarity within the medial temporal lobes. *Neuropsychologia* 2004;42(1):2-13.
  106. Reilly S. The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Res Bull* 1999;48(3):239-54.
  107. Reilly S. The role of the gustatory thalamus in taste-guided behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;22(6):883-901.
  108. Reilly S, Bornovalova MA. Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29(7):1067-88.
  109. Rolls ET, Cahusac PM, Feigenbaum JD, Miyashita Y. Responses of single neurons in the hippocampus of the macaque related to recognition memory. *Exp Brain Res* 1993;93(2):299-306.
  110. Roozendaal B, Castello NA, Vedana G, Barsegyan A, McGaugh JL. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 2008;90(3):576-9.
  111. Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 2003;83(3):803-34.
  112. Saunders RC, Aggleton JP. Origin and topography of fibers contributing to the fornix in macaque monkeys. *Hippocampus* 2007;17(5):396-411.
  113. Saunders RC, Murray EA, Mishkin M. Further evidence that amygdala and hippocampus contribute equally to recognition memory. *Neuropsychologia* 1984;22(6):785-96.
  114. Scalera G, Grigson PS, Norgren R. Gustatory functions, sodium appetite, and conditioned taste aversion survive excitotoxic lesions of the thalamic taste area. *Behav Neurosci* 1997;111(3):633-45.
  115. Swards TV. Dual separate pathways for sensory and hedonic aspects of taste. *Brain Res Bull* 2004;62(4):271-83.
  116. Swards TV, Swards MA. Cortical association areas in the gustatory system. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25(5):395-407.
  117. Squire LR, Stark CE, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:279-306.
  118. Squire LR, Wixted JT, Clark RE. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 2007;8(11):872-83.
  119. Stehberg J, Moraga-Amaro R, Simon F. The role of the insular cortex in taste function. *Neurobiol Learn Mem* 2011;96(2):130-5.
  120. Stone ME, Grimes BS, Katz DB. Hippocampal inactivation enhances taste

- learning. *Learn Mem* 2005;12(6):579-86.
121. Suzuki WA. The anatomy, physiology and functions of the perirhinal cortex. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6(2):179-86.
  122. Thierry AM, Gioanni Y, Degenetais E, Glowinski J. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 2000;10(4):411-9.
  123. Tokita K, Inoue T, Boughter JD, Jr. Subnuclear organization of parabrachial efferents to the thalamus, amygdala and lateral hypothalamus in C57BL/6J mice: a quantitative retrograde double labeling study. *Neuroscience* 2010;171(1):351-65.
  124. Tsvivilis D, Vann SD, Denby C, Roberts N, Mayes AR, Montaldi D, Aggleton JP. A disproportionate role for the fornix and mammillary bodies in recall versus recognition memory. *Nat Neurosci* 2008;11(7):834-42.
  125. Turner BH, Herkenham M. Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *J Comp Neurol* 1991;313(2):295-325.
  126. van der Kooy D, Koda LY, McGinty JF, Gerfen CR, Bloom FE. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol* 1984;224(1):1-24.
  127. Vann SD. Re-evaluating the role of the mammillary bodies in memory. *Neuropsychologia* 2009;48(8):2316-27.
  128. Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 2006;499(5):768-96.
  129. Wan H, Aggleton JP, Brown MW. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci* 1999;19(3):1142-8.
  130. Warburton EC, Brown MW. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 2010;48(8):2262-72.
  131. Wiig KA, Burwell RD. Memory impairment on a delayed non-matching-to-position task after lesions of the perirhinal cortex in the rat. *Behav Neurosci* 1998;112(4):827-38.
  132. Wilkins EE, Bernstein IL. Conditioning method determines patterns of c-fos expression following novel taste-illness pairing. *Behav Brain Res* 2006;169(1):93-7.
  133. Winters BD, Bartko SJ, Saksida LM, Bussey TJ. Scopolamine infused into perirhinal cortex improves object recognition memory by blocking the acquisition of interfering object information. *Learn Mem* 2007;14(9):590-6.
  134. Winters BD, Bussey TJ. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur J*

- Neurosci 2005;21(8):2263-70.
135. Winters BD, Bussey TJ. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* 2005;25(1):52-61.
  136. Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 2004;24(26):5901-8.
  137. Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32(5):1055-70.
  138. Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 2000;911:1-24.
  139. Wixted JT. Dual-process theory and signal-detection theory of recognition memory. *Psychol Rev* 2007;114(1):152-76.
  140. Wright CI, Groenewegen HJ. Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* 1996;73(2):359-73.
  141. Yamamoto T. Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Arch Histol Cytol* 2006;69(4):243-55.
  142. Yamamoto T, Fujimoto Y, Shimura T, Sakai N. Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions. *Neurosci Res* 1995;22(1):31-49.
  143. Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N. Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res* 1994;65(2):123-37.
  144. Yasui Y, Itoh K, Mizuno N. Projections from the parvocellular part of the posteromedial ventral nucleus of the thalamus to the lateral amygdaloid nucleus in the cat. *Brain Res* 1984;292(1):151-5.
  145. Yefet K, Merhav M, Kuulmann-Vander S, Elkobi A, Belelovsky K, Jacobson-Pick S, Meiri N, Rosenblum K. Different signal transduction cascades are activated simultaneously in the rat insular cortex and hippocampus following novel taste learning. *Eur J Neurosci* 2006;24(5):1434-42.
  146. Yonelinas AP. Receiver-operating characteristics in recognition memory: evidence for a dual-process model. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn* 1994;20(6):1341-54.
  147. Yonelinas AP, Aly M, Wang WC, Koen JD. Recollection and familiarity: examining controversial assumptions and new directions. *Hippocampus* 2010;20(11):1178-94.
  148. Zhu XO, McCabe BJ, Aggleton JP, Brown MW. Differential activation of the rat hippocampus and perirhinal cortex by novel visual stimuli and a novel

- environment. *Neurosci Lett* 1997;229(2):141-3.
149. Zhu XO, McCabe BJ, Aggleton JP, Brown MW. Mapping visual recognition memory through expression of the immediate early gene c-fos. *Neuroreport* 1996;7(11):1871-5.
150. Zola-Morgan S, Squire LR, Mishkin M. The neuroanatomy of amnesia: amygdala-hippocampus versus temporal stem. *Science* 1982;218(4579):1337-9.
151. Zola SM, Squire LR, Teng E, Stefanacci L, Buffalo EA, Clark RE. Impaired recognition memory in monkeys after damage limited to the hippocampal region. *J Neurosci* 2000;20(1):451-63.

*Financiado por PSI2011-23702 (MICINN) con fondos FEDER*

## Capítulo 9

# **Avances en genética psiquiátrica: luces y sombras de una disciplina compleja**

**A. Ching-López  
B. Gutiérrez**



# Avances en genética psiquiátrica: luces y sombras de una disciplina compleja.

Ana Ching-López 1,2, y Blanca Gutiérrez 1,2,3.

1. Instituto de Neurociencias Federico Olóriz, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada,

2. Departamento de Psiquiatría, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España

3. CIBERSAM, Universidad de Granada, España.

E-mail: aching@ugr.es

Muchos trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, el trastorno bipolar o el autismo, son altamente heredables, y aunque la identificación de los factores genéticos subyacentes y la definición del papel fisiopatológico de las variaciones moleculares se hayan visto obstaculizadas por la falta de replicación de muchos de los resultados, se sigue confiando en la Genética como herramienta. Hacemos un repaso sobre la evolución de la genética psiquiátrica desde los estudios de familia, gemelos y adopción hacia los más recientes estudios moleculares que finalmente se dirigen hacia una visión más integradora y colaborativa como son los estudios de interacción gen-ambiente. Se exponen los principales hallazgos y limitaciones derivados de dichos estudios, así como nuevos enfoques (anomalías cromosómicas estructurales, modelos animales, epigenética) y perspectivas de futuro (mejora en la definición de los trastornos, desarrollo de nuevos tratamientos, terapia génica).

---

Según la ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th version), trastorno mental es la presencia de síntomas mentales o alteraciones del comportamiento que se acompañan de malestar e interfieren en la actividad del individuo [40].

Estos trastornos mentales, además de representar uno de los enigmas mejor guardados de la medicina [68], suponen alrededor de un tercio de la discapacidad mundial, siendo asimismo causa de enormes cargas tanto personales como para la sociedad [32,77].

Una de cada cuatro personas padecerá alguna enfermedad mental a lo largo de su vida. Y aunque la mortalidad aumenta para muchos de estos trastornos, su principal impacto, como se refiere anteriormente, reside en la morbilidad [41].



A pesar de su gran importancia, las enfermedades mentales son todavía grandes desconocidas debido en parte a la inaccesibilidad del cerebro. Nos enfrentamos ante un órgano nada fácil de estudiar y de cuya fisiología normal poseemos escaso conocimiento. Por ello, no es sorprendente que resulte tan complicado el estudio de su anormal funcionamiento en este tipo de trastornos. La salud mental está condicionada por la influencia de múltiples factores de diversa índole, tanto de naturaleza biológica (ej. factores genéticos) como psicosocial y ambiental (ej. rasgos de personalidad, acontecimientos vitales estresantes, el hecho de contar o no con apoyo social) [10,18], pero en el presente trabajo nos centraremos en los adelantos que se han producido en el conocimiento de las bases genéticas de los trastornos psiquiátricos. Haremos un repaso de la evolución de la genética psiquiátrica desde los estudios de familia, gemelos y adopción hacia los más recientes estudios moleculares que finalmente nos han dirigido a una visión más integradora y colaborativa como son los estudios de interacción. También nos detendremos brevemente en exponer los principales hallazgos y limitaciones derivados de dichos estudios, así como presentar nuevos enfoques y perspectivas de futuro.

Muchos trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, el trastorno bipolar o el autismo, son altamente heredables, y aunque la identificación de los factores genéticos subyacentes y la definición del papel fisiopatológico de las variaciones moleculares se hayan visto obstaculizadas por la falta de replicación de muchos de los resultados, se sigue confiando en la Genética como humilde candidata para tratar de dilucidar parte del enigma [68]. Pero, como Kendler y Eaves discutieron hace más de veinte años en uno de sus artículos: “Creemos que un completo entendimiento de la etiología de la mayoría de los trastornos psiquiátricos requerirá la comprensión de los factores de riesgo genéticos relevantes, de los factores de riesgo ambientales relevantes, y las formas en que ambos factores de riesgo interaccionan” [43].

Un gran atractivo de la aproximación genética, aparte de que ha dado buenos resultados y se encuentra bien establecida en otros campos de la medicina, es que permite acceso indirecto a procesos que de otra forma serían

difíciles de estudiar en personas vivas. Así, una vez identificados los cambios en el DNA, se permite la posibilidad de inferir las anomalías fisiológicas que conducen a la enfermedad [54]. Pero para ello, nos sería de gran utilidad familiarizarnos antes con algunos aspectos básicos sobre genética que faciliten el entendimiento de los temas tratados en la presente revisión

## **Nociones básicas sobre genética**

Algunos definen la Genética como la disciplina científica que estudia la herencia biológica que se transmite de generación en generación. Afecta a la humanidad de formas muy diversas y ha llegado a ocupar una posición crucial en nuestras vidas, habiendo aportado conceptos nuevos que tienen mucho que decir sobre nuestra propia naturaleza y posición en el Universo [36].

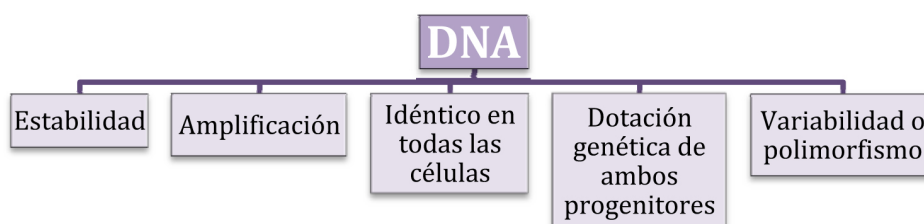
Esta disciplina, como cualquier otra, cuenta con terminología específica que puede resultarnos desconocida. Por ello y para ayudar a una mejor comprensión, se han incluido en el Cuadro 1 algunos conceptos frecuentemente utilizados en genética psiquiátrica.

La molécula protagonista en genética es el ácido desoxirribonucleico, también conocido por sus siglas en inglés DNA (Deoxyribonucleic acid). Esta molécula puede considerarse como una copia genética única y original de un individuo, que, en general, además de encontrarse en cada una de las células nucleadas de nuestro cuerpo, permanece constante a lo largo de la vida [36].

Gracias a ella se han podido dar grandes pasos en un área importante de la actividad humana como es la investigación biomédica en general y la genética psiquiátrica en particular. El poder analizar el DNA de las muestras biológicas y el desarrollo de las tecnologías relacionadas ha supuesto la apertura de nuevas y esperanzadoras opciones de investigación de los trastornos psiquiátricos.

Esta molécula, además de ser la que porta la información necesaria para el desarrollo de los rasgos biológicos de un individuo y contener las instrucciones para que las células realicen sus funciones, presenta una serie de características (Figura 1) que lo hacen muy adecuado para las investigaciones biomédicas.

Por esta serie de características básicas, la tecnología del DNA ha dejado atrás los límites que presentaban otras técnicas. En general, no había sido posible utilizar procedimientos analíticos tan potentes y seguros para la sociedad; y es que, en el ejemplo de las ciencias biomédicas, la genética molecular es capaz de abordar la búsqueda de genes involucrados en el origen de enfermedades con claro componente genético sin siquiera conocer nada acerca de la fisiopatología de dichas enfermedades [18].



**Figura 1. Características del DNA útiles para aplicaciones biomédicas.**

Aunque depende del estado de conservación de la muestra, generalmente tiene gran estabilidad. Permite amplificación dando lugar a miles de copias de sus fragmentos. Es en la mayoría de los casos idéntico en todas las células de un mismo individuo, lo que proporciona capacidad de estudiar casi cualquier célula o tejido. La dotación genética proviene de sus progenitores permitiendo así el establecimiento de relaciones de parentesco, y, por último, presenta variabilidad o polimorfismo, lo que nos permite diferenciar entre individuos.

Toda la secuencia de DNA conforma el genoma, es decir, la composición genética completa, que, a excepción de los gemelos univitelinos o monozigóticos es única para cada individuo, heredándose la mitad del progenitor masculino y la otra mitad del femenino.

En cifras y resumiendo, podríamos decir que el genoma humano supone  $3 \times 10^9$  pares de bases, 23 parejas de cromosomas y 25.000-30.000 genes (Figura 2). Con respecto a esto, se estima que la gran mayoría de nuestro DNA, aproximadamente el 99,7%, es el mismo entre personas, y sólo una pequeña fracción de alrededor del 0,3% difiere y nos hace únicos. Así, las regiones variables del genoma humano nos aportan capacidad para usar su información con propósitos de identificación genética [53].

La variación que observamos en los individuos es debida en gran medida

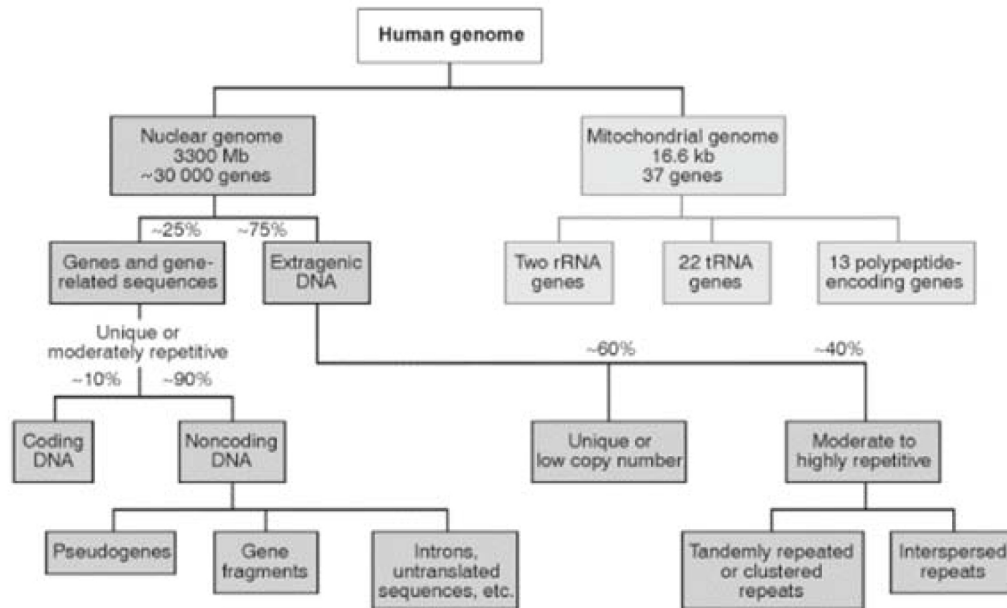


Figura 2. Organización del Genoma Humano [53].

En este esquema se muestra la organización general del genoma humano, surgiendo una primera división que separa el genoma nuclear, localizado en el núcleo celular, del mitocondrial, localizado en las mitocondrias. Se puede observar que el DNA que conforma los genes y secuencias relacionadas representa aproximadamente un 25% del genoma nuclear, y que del total de éste, un 10% corresponde a DNA codificante y un 90% a DNA no codificante.

a la variación genética, a la que hay que “sumar” la variación producida por la influencia de nuestro ambiente. La variación genética que nombramos en primer término, se debe a su vez a la presencia de cambios genéticos que se heredan de una célula a sus hijas o a la generación siguiente si las células afectadas pertenecen a la línea germinal.

Esta variación del DNA se exhibe en forma de distintos cambios en el genoma:

- La secuencia de DNA del genoma de una especie sufre mutaciones puntuales, inserciones/delecciones y/o reorganización de fragmentos cromosómicos a lo largo de su evolución. La mayoría de estos cambios se acumulan en regiones no codificantes ya que los cambios ocurridos durante la evolución en secuencias codificantes están sujetos a presión selectiva. Por esto, según los estudios a los que nos enfrentemos, interesa trabajar con uno u otro tipo de secuencias, siendo las que afectan a regiones

codificantes de gran utilidad y actualidad en análisis de genética psiquiátrica [10,22].

- Un locus puede presentarse en diversas formas o alelos a causa de variaciones en la secuencia, y el porcentaje en que se presente ese alelo en la población general es lo que se denomina frecuencia alélica. Cuando un locus presenta al menos dos alelos y la frecuencia alélica de la forma más rara es del 1% o superior, se dice que el locus es polimórfico, y la variación se denomina polimorfismo [53]. Estos pueden encontrarse tanto en el DNA intragénico como en el extragénico, normalmente no se asocian a estados patológicos, son muy útiles en estudios genéticos por estar presentes a lo largo de todo el genoma y se utilizan como marcadores en estudios de ligamiento y asociación.

Existen diferentes tipos de polimorfismos: secuencias repetidas dispersas, secuencias repetidas en tándem (DNA satélite, VNTR - Variable Number of Tandem Repeats, STR - Short Tandem Repeat), SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Este último tipo de polimorfismo consiste en el cambio de un único nucleótido en la secuencia de DNA, es muy frecuente en el genoma (1 cada 1000 pares de bases) y su estudio se ha convertido en gran aliado de la investigación biomédica para la obtención de información tanto de enfermedades como de rasgos normales [45]. Serán especialmente interesantes aquellos situados en regiones promotoras o codificantes de genes [18].

Las aplicaciones de estos polimorfismos de DNA siguen en aumento. No solo son la herramienta básica en disciplinas como la genética forense, sino que también despuntan en biomedicina en diversos campos como el diagnóstico de enfermedades, la medicina personalizada y los GWAS o estudios de asociación del genoma completo [69].

Para analizar estos polimorfismos de DNA usados en genética psiquiátrica se utilizan técnicas que están en continua evolución desde que nació la biología molecular hace unos 50 años, consiguiendo cada vez resultados más prometedores.

*Cuadro 1. Glosario de términos en genética psiquiátrica*

- Alelo:** cada una de las formas alternativas en que puede encontrarse un gen
- Frecuencia alélica:** porcentaje en que se presenta un alelo en la población general
- Gen:** secuencia de DNA que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula, habitualmente proteínas pero también mRNA, rRNA y tRNA
- Locus (loci en plural):** lugar físico donde se localiza un gen en el cromosoma
- Genoma:** el conjunto de todo el DNA de un organismo
- Genotipo:** constitución genética de un individuo; combinación de alelos en un *locus* concreto
- Fenotipo:** la expresión de los genes en un determinado ambiente; cualquier característica de un organismo resultado del genotipo y ambiente
- Polimorfismo:** variación genética en un locus concreto del genoma que supone la existencia de cómo mínimo dos variantes o alelos con, al menos, un 1% de proporción en una población. Ejemplo, sistema AB0 que determina el grupo sanguíneo
- SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism* o polimorfismo de un solo nucleótido. Variación en la secuencia de DNA que afecta a una sola base en la secuencia del genoma
- Marcador genético:** segmento de DNA con ubicación física conocida en un cromosoma (*locus*) y cuya herencia genética se puede rastrear
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa; método que permite amplificar una región específica del genoma hasta obtener millones de copias de la misma en pocas horas. Este mecanismo trata de simular *in vitro* lo que ocurre en una célula real cuando se replica, por lo que tendrán que proveerse artificialmente todas las condiciones necesarias
- Mutación:** cualquier cambio heredable producido en la secuencia de DNA
- Heredabilidad:** medida estadística que nos indica la proporción de la varianza fenotípica que puede ser explicada por la varianza genética, o lo que es lo mismo, puede ser atribuida a factores genéticos
- Vulnerabilidad genética:** diferencias genéticas existentes en un individuo que lo hacen más vulnerable al efecto de factores ambientales
- Heterogeneidad de locus:** cuando la variación en distintos genes afecta al mismo fenotipo
- Penetrancia:** probabilidad de observar un mismo fenotipo en individuos que tienen un genotipo particular
- Gen candidato:** gen que puede estar implicado en una enfermedad particular; puede ser un candidato biológico o posicional
- Enfermedad compleja:** aquella que no se transmite siguiendo un patrón simple de herencia mendeliana, y cuya génesis se deriva de la combinación de numerosos factores genéticos, ambientales y de estilo de vida. De hecho, son raras las enfermedades que exhiban un patrón simple de herencia mendeliana
- Familiaridad:** similitud entre familiares en términos de agregación de un rasgo específico dentro de la familia
- Riesgo relativo:** relación entre el riesgo para la enfermedad en familiares de 1er grado de individuos con el trastorno, dividido por el riesgo en familiares de 1er grado de controles
- Riesgo mórbido:** riesgo para padecer una enfermedad, es decir, riesgo de convertirse en afectado
- Genómica:** disciplina científica que busca entender el papel del genoma en el desarrollo, función y organización de las células en estructuras mayores
- Desequilibrio de ligamiento:** Cuando dos *loci* de un mismo cromosoma se encuentran asociados heredándose por tanto en bloque
- Caso-control:** estudio donde se comparan frecuencias genotípicas, alélicas o de haplotipos entre una cohorte de personas que presentan la enfermedad y un grupo control
- OR:** *Odds ratio*; medida estadística que se define como la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro. Es una forma de expresar la proporción de veces que es más frecuente que un suceso ocurra frente a que no ocurra
- GWAS:** *Genome-wide association studies* o estudios de asociación del genoma completo. Estudio tipo caso-control donde se analizan millones de variantes genéticas (SNPs generalmente) a lo largo de todo el genoma
- GxE:** Interacción gen-ambiente
- Endofenotipo:** fenotipos intermedios del trastorno, esto es, constituyentes neurofisiológicos, bioquímicos, endocrinológicos, neuroanatómicos o neuropsicológicos del mismo. Se asume que tienen una base genética más sencilla que los trastornos
- Epigenética:** estudio de los cambios heredables en la expresión génica sin cambio en la secuencia de DNA. El término se refiere a modificaciones funcionalmente relevantes en el genoma que no implican cambio en la secuencia de nucleótidos

## **¿Por qué algunas personas desarrollan enfermedades mentales y otras no?**

Como comentó Jeffrey Friedman al recibir el premio Fundación BBVA Fronteras del Conocimiento en Biomedicina, en su caso refiriéndose a la obesidad, hemos de mirar la enfermedad mental no como un fracaso personal sino como una diferencia biológica [52].

Según el Diccionario de la Lengua Española [58], ‘diferencia’ es: cualidad o accidente por el cual algo se distingue de otra cosa; variedad entre cosas de una misma especie. Es en estas diferencias en las que hemos de centrar nuestros esfuerzos.

La idea de heredabilidad en las enfermedades mentales ha estado rondando desde los comienzos de la psiquiatría, pero fue a finales del siglo XIX, tras los trabajos de Henry Maudsley, Sir Francis Galton y Emil Kraepelin entre otros, cuando esa base hereditaria fue realmente reconocida [5,10]. En base a estudios de agregación familiar y de gemelos, se ha puesto de manifiesto que la mayoría de trastornos mentales graves tienen una alta heredabilidad, que oscila entre el 40 y el 80% dependiendo del diagnóstico. De hecho, estos valores de heredabilidad son más elevados que los estimados para otras enfermedades donde los factores genéticos de riesgo están ya muy bien asentados [70]. Nos referimos al cáncer de mama, cuya heredabilidad se encuentra entre un 5 y un 60% y el Parkinson, entre 13 y 30% [10].

Sin embargo, en la mayoría de los casos se desconocen en gran medida las causas que subyacen a las enfermedades mentales, carecen de patrones hereditarios claros, y se clasifican como enfermedades genéticamente complejas; que en última instancia son enfermedades que no obedecen un patrón de herencia mendeliano y están determinadas por numerosos factores genéticos (heterogeneidad de locus) y ambientales trabajando juntos [21,27,46,57].

Además de carecer de homogeneidad en su etiología por tratarse de enfermedades complejas, los trastornos psiquiátricos también carecen de

fenotipos bien definidos o estables (debido a penetrancia incompleta, interacción con factores no genéticos y/o rasgos no bien especificados). Por eso los diagnósticos representan definiciones operacionales más que entidades bien definidas [49]; añadido el hecho de que, a diferencia de otras enfermedades, hay pocas pruebas diagnósticas de validación (tests bioquímicos, radiológicos, fisiológicos, genéticos).

Todo ello dificulta y retrasa los estudios de identificación de los factores causantes de la enfermedad mental.

A pesar de los considerables esfuerzos que se han hecho hasta la fecha, la investigación en el campo de la psiquiatría genética no ha logrado aún servir de mucha ayuda en mitigar el sufrimiento de aquellos que padecen trastornos mentales. Sin embargo, el progreso sin precedentes de los últimos 5 años y el vertiginoso desarrollo de las tecnologías del DNA parecen disolver cualquier atisbo de duda entre la comunidad científica [44,68]. Paso a paso, sin grandes revoluciones, estos y futuros avances mejorarán el conocimiento existente sobre la etiología de las enfermedades mentales [67].

## **¿Qué nos conduce a pensar que existe un componente genético en la etiología de una enfermedad? Evidencias**

La investigación en genética en general, y en genética psiquiátrica en particular se sirve de distintos métodos para alcanzar sus objetivos, que al igual que la metodología, han ido variando con el tiempo.

Los primeros estudios realizados presentan la premisa fundamental de que un trastorno es causado por factores genéticos, de modo que los individuos que están genéticamente relacionados debieran compartir riesgos parecidos para el trastorno [64].

Los estudios familiares, de gemelos y de adopción han proporcionado evidencias sobre el papel de la genética en numerosos trastornos psiquiátricos



como la esquizofrenia, el trastorno bipolar, la depresión mayor o la enfermedad de Alzheimer [2,63,64]. Demostrar que un comportamiento se agrega en familias, a través de estos estudios, es el primer paso para establecer la existencia de una base genética en una enfermedad [30,64], sin embargo, se trata de una condición necesaria pero no suficiente para la heredabilidad, ya que la similaridad entre familiares puede ser debida no solo a genes compartidos sino también a un mismo entorno [18,64].

Cada aproximación goza tanto de puntos fuertes como de limitaciones, pero a lo largo de la historia se ha ido progresando de manera que se sigue aportando nueva luz para el esclarecimiento de las causas que subyacen a los trastornos mentales [49].

### **Estudios familiares**

En este tipo de estudios se compara la frecuencia con la que aparece un determinado trastorno en la familia del individuo afectado, respecto a la frecuencia encontrada para el mismo carácter en la población general. En el caso de existir una base genética para la enfermedad, la prevalencia entre los familiares de los individuos afectados será mayor que en la población general [61].

Los estudios de familia pueden determinar familiaridad, no obstante, no pueden discriminar si la agregación dentro de las familias se debe a causas genéticas o ambientales, generalmente compartidas entre familiares [18,30,61]. A pesar de que esto supone la limitación más destacable de estos estudios, conservan su importancia como punto de partida de la epidemiología genética. En la Tabla 1 se muestran los principales hallazgos alcanzados gracias a este tipo de estudios [11].

Además, los estudios de familia suponen un potente método para identificar interacción gen-ambiente (GxE), como demuestran, por ejemplo, los estudios de Cannon et al. en los años 1990 y 1993, en los que se comparaban niños de alto riesgo (padres con psicopatología) con individuos controles de bajo riesgo. En el primer estudio, la crianza institucional se asoció con un riesgo

elevado de esquizofrenia solo entre aquellos niños con predisposición genética [12]. En el segundo se reevaluó el riesgo genético por tener uno o ambos padres afectados, y se vio una significativa interacción entre el grado de riesgo genético y complicaciones en el nacimiento en la predicción de un aumento del ventrículo. Mayor aumento en los sujetos con un padre afectado respecto a los individuos control, y un todavía mayor aumento aquellos con dos padres afectados [13]. Esta utilidad de los estudios familiares no está muy extendida debido a su coste económico (examen de los sujetos durante un largo periodo de tiempo), y también al elevado número de individuos de alto riesgo necesarios en la muestra para poder contar después con suficientes afectados (baja tasa de los trastornos mentales en general) [30].

### **Estudios de gemelos**

En estos estudios se comparan las tasas de concordancia para un determinado trastorno en gemelos monozigóticos (MZ; comparten todos sus genes) respecto a las tasas en gemelos dizigóticos (DZ; comparten de media solo la mitad de sus genes). Ambos tipos de gemelos comparten también un mismo entorno, lo que permite estimar la contribución relativa de genes y ambiente en la etiología de la enfermedad. Así, comparando las concordancias entre los diferentes tipos de gemelos, podemos estimar la heredabilidad [61].

Los estudios clásicos implicaban comparaciones de gemelos monozigóticos y dizigóticos criados juntos, pero también han sido y son importantes como método para estudiar la interacción GxE por ejemplo analizando gemelos monozigóticos que se han criado aparte [75]. Esto presta la posibilidad única de estudiar la influencia de diferentes ambientes en un genotipo idéntico. En la Tabla 1 se muestran los principales hallazgos derivados de los estudios de gemelos.

### **Estudios de adopción**

El objetivo de este tipo de estudios es discernir los factores etiológicos que son de naturaleza genética de los que no, para lo que se compara el riesgo

mórbido de los familiares biológicos y de los adoptivos de individuos enfermos que fueron adoptados de niños. Si los genes desempeñan un papel determinante, la transmisión se detectará en la familia biológica y no en la adoptiva.

Esto es así porque los niños adoptados a muy temprana edad comparten ambiente con su familia adoptiva pero tienen lazos genéticos con su familia biológica [61].

De forma análoga al resto de estudios de genética clásica comentados anteriormente, estos estudios también suponen un gran método para detectar interacciones gen

Tabla 1. Principales hallazgos de estudios de genética clásica en algunos trastornos mentales (Parte 1) [3,10,61,64]

Trastorno	
<b>Trastorno Depresivo Mayor (MDD)</b>	<p><b>Definición</b> Más que tristeza, estado de ánimo severamente deprimido, pérdida de interés y placer por las actividades diarias, falta de energía, sentimientos de inutilidad, culpa y pensamientos pesimistas</p> <p><b>Principales hallazgos</b> <u>Estudios familiares:</u> - Riesgo mórbido incrementado de 15-25% para depresión mayor en familiares de individuos afectados - Descrito efecto de edad de inicio de la enfermedad y nº episodios depresivos en agregación familiar. Riesgo incrementado para depresión en familiares de individuos afectados entre un 3.4%, cuando edad de inicio de enfermedad tardía y nº episodios bajo, y un 17.4% en familiares de pacientes con forma recurrente de enfermedad que empezó a edad temprana. Parece que aparición temprana de la enfermedad y la presencia de múltiples episodios depresivos incrementan la agregación familiar - Riesgo relativo entre 1.5 y 3 veces superior en familiares de 1<sup>er</sup> grado de individuos afectados de MDD comparado con población general - Afecta a mujeres el doble que a hombres <u>Estudios de gemelos:</u> - Concordancia = MZ: 46%; DZ: 20% - Hay estudios tanto a favor como en contra de una posible influencia del sexo y la edad de inicio de la enfermedad en la heredabilidad de la misma <u>Estudios de adopción:</u> - Resultados no concluyentes, aunque parecen apuntar importancia de factores genéticos, sobre todo en las formas más graves de depresión  - Comorbilidad con trastornos relacionados con sustancias <b>Heredabilidad = 40%</b></p>
<b>Trastorno Bipolar (BP)</b>	<p><b>Definición</b> Trastorno mental severo caracterizado por alteración en el estado de ánimo que incluye cambios en ambas direcciones (desde extremos de felicidad, energía y claridad hacia tristeza, fatiga y confusión)</p> <p><b>Principales hallazgos</b> <u>Estudios familiares:</u> - Riesgo mórbido para el BP en familiares de 1<sup>er</sup> grado de afectados con BP varía entre 3-15% - Solo algunos pocos estudios incluyeron controles sanos para comparar - Edad de inicio - riesgo mórbido más elevado en familiares de probandos con comienzo temprano (&lt;25) que tardío - Parece no haber diferencias en riesgo de padecer BP según el sexo <u>Estudios de gemelos:</u> - Concordancia = MZ: 70%; DZ: 19% - Existen pocos estudios, pero en general los resultados son consistentes con los estudios de familia <u>Estudios de adopción:</u> - Solo 2 estudios de adopción realizados usando concepto BP usado hoy día - Más probable que padezcan el trastorno los padres biológicos de adoptados con BP que los adoptivos  - Comorbilidad con trastornos varios (MDD, trastornos relacionados con sustancias,...) <b>Heredabilidad = 60-85%</b></p>

-ambiente.

En la Tabla 1 se pueden observar los hallazgos principales obtenidos a través de estudios de adopción. No obstante, también poseen algunas limitaciones, por ejemplo: los padres biológicos y adoptivos de hijos adoptados no suelen ser representativos de la población general, de forma que se limita la extrapolación de los resultados [43]; la capacidad de separar factores genéticos y ambientales depende de la edad en que se produzca la adopción, e incluso así, siempre habrá tenido lugar un contacto pre y perinatal con los padres biológicos.

Con el paso de los años, gracias a la aparición de nuevas tecnologías y avances en el conocimiento, otras técnicas se van abriendo camino entre las que ya existían; surgen nuevos métodos que suplen, o al menos lo intentan, carencias previas. Una vez establecida la existencia de una base genética en los trastornos mentales principales, y teniendo la biología molecular de nuestro lado, es momento de tratar de identificar los genes responsables. Se da paso a 3 estrategias diferentes: i) Análisis de ligamiento y análisis de asociación cuya meta es correlacionar los trastornos psiquiátricos con diferencias individuales en la secuencia de DNA (asume relación directa entre genes y comportamiento); ii)

Endofenotipos o fenotipos intermedios que reemplazan las etiquetas diagnósticas de la enfermedad; iii) Interacción gen-ambiente (GxE), es decir, patógenos ambientales son los que causan el

Trastorno	Tabla 1 (Parte 2)
<b>Esquizofrenia (SCZD)</b>	<p><b>Definición</b> Trastorno mental severo que puede incluir síntomas positivos (alucinaciones, delirios, interferencia con los procesos mentales) y negativos (apatía, aislamiento social)</p> <p><b>Principales hallazgos</b></p> <p><u>Estudios familiares:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gran cantidad de bibliografía indicando agregación familiar en SCZD</li> <li>- Riesgo mórbido 2-9% mayor en familiares de 1<sup>er</sup> grado de enfermos de SZ comparado con familiares de controles (0-1%)</li> <li>- Resultados no concluyentes con respecto a diferencias en tasas de SZ dependiendo del sexo o la edad de inicio de la enfermedad</li> </ul> <p><u>Estudios de gemelos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Concordancia = MZ: 40-50%; DZ: 14%</li> <li>- Estudios de hijos de gemelos MZ discordantes (uno padece la enfermedad y el otro no) → riesgo para SCZD no difiere en la descendencia. Tienen igual predisposición genética, luego diferencia en fenotipo probablemente debida a factores ambientales</li> <li>- Descrita la transmisión genética de trastornos asociados</li> </ul> <p><u>Estudios de adopción:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1<sup>er</sup> estudio de adopción de SCZD, Heston en 1966 → adoptados con madres biológicas esquizofrénicas tenían mayor riesgo de padecer SCZD que aquellos con madres biológicas sin SCZD. Resto de literatura con resultados consistentes</li> <li>- Evidencias de comorbilidad con BP, trastornos afectivos psicóticos y trastornos de personalidad</li> </ul> <p><b>Heredabilidad = 70-85%</b></p>

trastorno mientras que los genes influyen la susceptibilidad a dichos patógenos.

### **Análisis de ligamiento (Linkage analysis)**

Bastante antes de que el genoma humano fuera secuenciado, se podía mapear la localización de los genes a cromosomas específicos. Para ello no era necesario conocer la secuencia de DNA, simplemente se necesitaba seguir la transmisión del gen en la familia basándose en distintos fenotipos asociados a diferentes alelos del mismo gen [21].

Este tipo de análisis habitualmente se sirven de genealogías en que la enfermedad está presente en distintos familiares y se asume un patrón de herencia mendeliano. En estas familias se estudia la segregación de un determinado marcador genético y se ve si existe independencia entre la transmisión de la enfermedad y los diferentes alelos del marcador. Si la enfermedad y un alelo determinado se transmitieran de forma conjunta (en desequilibrio de ligamiento), se podría sugerir la existencia de un gen para la enfermedad situado cerca del polimorfismo usado como marcador [18,61].

Entre las limitaciones que presentan este tipo de estudios, destacamos: tienen bajo poder para detectar los alelos de efecto menor en las enfermedades complejas; los resultados son muy sensibles a errores de genotipado, cambios en el diagnóstico de los familiares del paciente y problemas de heterogeneidad genética [10,18].

Se han realizado numerosos estudios de este tipo en trastorno bipolar y esquizofrenia, pero han sido escasos en depresión mayor [61]. Los resultados derivados se incorporaron estudios de asociación de genes candidatos posicionales [10].

### **Estudios de asociación genética**

Al enfrentarnos a enfermedades genéticamente complejas, y saber ya desde 1996 gracias a Risch y Merikangas que los estudios de asociación tienen más poder en la detección de genes de efecto menor que los estudios de

ligamiento, nos encontramos ante el tipo de estudios que ha representado la mejor alternativa para la identificación de genes responsables en la etiología de enfermedades mentales [10,60]. En sus inicios se basaron en genes candidatos, pero desde 2007 se han convertido en estudios de genoma completo.

Normalmente el diseño de los estudios de asociación se corresponde al de un estudio caso-control, donde se compara la frecuencia de un posible factor de riesgo en personas no emparentadas afectadas por una misma enfermedad con la frecuencia observada en personas sanas del mismo grupo étnico, la población control. En los estudios de asociación genética el factor de riesgo es siempre un marcador o polimorfismo genético habitualmente localizado en un gen candidato para la enfermedad. Si el polimorfismo analizado es significativamente más frecuente en el grupo de enfermos que en el de controles, diremos que existe una asociación entre dicho alelo y la enfermedad. Los resultados se dan en términos de riesgo relativo, como odds ratio (OR), una medida estadística que nos da idea del tamaño del efecto. En definitiva no es más que una forma de expresar cuántas veces es más frecuente la enfermedad en individuos con el marcador que en aquellos sin él.

Los genes candidatos en que se basan estos estudios pueden ser candidatos biológicos o posicionales. Los primeros son genes relacionados, conocida o hipotéticamente, con rutas metabólicas implicadas en la enfermedad o con la síntesis de proteínas target de fármacos, mientras que los segundos son cualquier gen que se localice dentro de una región cromosómica implicada por ligamiento. De entre los candidatos biológicos, destacan dos variantes por considerarse bien establecidas en la actualidad: i) La primera es una variante genética protectora, un alelo nulo funcional de una enzima que degrada el alcohol (ALDH2\*2), la aldehído deshidrogenasa 2. Más presente en los individuos del sudeste asiático, protege a sus portadores del riesgo de alcoholismo ya que les produce una nada placentera evacuación ante el consumo de alcohol; ii) La segunda es una variante genética de riesgo (5HTTLPR = 5-hydroxytryptamine transporter gene-linked polymorphic region) en el promotor del gen del transportador de serotonina 5HTT (gen SLC6A4), que es

diana de la mayoría de los antidepresivos [10].

En estos estudios es muy importante una buena definición de la enfermedad para asegurar la homogeneidad etiológica de los individuos, lo que en el caso de los trastornos psiquiátricos nos supone una limitación, ya que, como hemos comentado anteriormente, la atribución de un diagnóstico no es tan sencilla y homogénea como se desearía. No hay que descartar que se produzcan falsos positivos por azar, estratificación étnica de la muestra, multiple testing, heterogeneidad alélica, etc. [10].

Los genes candidatos, y los avances tecnológicos, dan paso a los esperanzadores GWAS o estudios de genoma completo [6,28,29,31,33,34,55,56,62,69,72]. Se trata de un estudio tipo caso-control en el que la muestra de DNA de cada individuo es analizada para millones de variantes genéticas, generalmente SNPs, a lo largo de todo el genoma. Al tener un diseño caso-control, también comparten las limitaciones de ese tipo de diseños, pero cada vez se realizan mejores GWAS en trastornos mentales [71,74]. Al principio ninguno logró arrojar ningún resultado consistente, muy probablemente debido a que no se alcanzaban tamaños muestrales tan elevados como los utilizados en estudios de diabetes tipo II, donde contaba con 38,000 casos y controles, en comparación con los pocos miles que con suerte se conseguían para trastornos mentales. Pero, con el paso del tiempo y gracias a tamaños muestrales mucho más elevados, se han logrado resultados significativos. Por ejemplo, el Consorcio de Psiquiatría Genómica (PGC) publicó recientemente un mega-análisis para esquizofrenia y trastorno bipolar en el que identificaron significativamente 7 y 2 loci respectivamente. En el trastorno bipolar destaca la subunidad del canal de calcio CACNA1C, y en esquizofrenia la región del complejo mayor de histocompatibilidad (región MHC) [68].

Existen gran cantidad de estudios de asociación genética en enfermedades mentales, pero, sin todavía el éxito esperado en los hallazgos, pocos son los genes en que se ha encontrado asociación descrita y replicada por grupos independientes [18,61]. En la Tabla 2 se resumen los genes que hasta el momento se han asociado fuertemente a distintos trastornos.

Tabla 2. Genes asociados a trastornos psiquiátricos

Gen	Locus	Hallazgos
Alcohol deshidrogenasa 2	ADH2	Actividad incrementada de la enzima asociada a protección frente alcoholismo
Aldehído deshidrogenasa 2	ALDH2	Actividad baja o nula de la enzima asociada a protección frente alcoholismo
Catecol-O-metiltransferasa	COMT	Asociación con procesamiento cognitivo y umbral del dolor
Receptor de dopamina D4	DRD4	Asociación con ADHD (Trastorno de déficit de atención e hiperactividad)
Receptor de GABA A subunidad alfa 2	GABRA2	Asociación con trastornos de abuso de alcohol y endofenotipos
Monoamino oxidasa A	MAOA	Variante nula asociada a comportamiento impulsivo-agresivo y variante funcional en el promotor asociada a comportamiento impulsivo y antisocial en interacción con maltrato
Transportador de solutos familia 6, miembro 4	SLC6A4 o SERT	Alelo s asociado con neuroticismo incrementado y síntomas de depresión en interacción con factores ambientales, y asociado también a muchos otros rasgos de comportamiento. También asociado a procesamiento de la amígdala (evidencias de fMRI)

## Endofenotipos

Los estudios descritos hasta el momento hacen uso de etiquetas diagnósticas cerradas, pero ¿y si las variantes genéticas incrementaran o redujeran un rasgo cuantitativo?, ¿y si en lugar de límites artificiales, los rasgos y trastornos se solaparan situándose entonces en un continuum que viaja desde el rasgo normal hasta el trastorno debido a la interacción de diversos factores? Tras la idea de que algunos trastornos psiquiátricos podrían estar en el extremo final de determinadas variaciones de personalidad, nacen los endofenotipos. Estos fenotipos intermedios del trastorno se asume que tendrían una base genética más sencilla, y por tanto su estudio también sería más sencillo [35,50]. Los estudios de asociación realizados con endofenotipos han ayudado a la identificación genética y siguen siendo muy prometedores [26]. Por ejemplo, como se ve en la Tabla 2, se encuentran resultados concluyentes sobre la asociación del alelo s del transportador de serotonina 5-HTT con un endofenotipo de la depresión, el neuroticismo elevado.



## **Interacción gen-ambiente (GxE)**

Esta aproximación nace de dos observaciones, que los trastornos mentales tienen causas ambientales y que las personas muestran heterogeneidad en su respuesta a esas causas. La diferencia principal con el resto de aproximaciones de estudio es que se asume que son patógenos ambientales los que causan el trastorno, mientras que los genes influyen en la susceptibilidad a estos patógenos. Esta hipótesis también está siendo estudiada en otras patologías como son el cáncer y la diabetes [16,61].

Se trata de una estrategia que está bastante de actualidad y tiene especial importancia ya que, como dijeron Moffitt et al. en 2005, sin la aproximación genético-ambiental la conexión de cada gen con la enfermedad podría haberse anulado de forma errónea [51]. Aunque este tipo de estudios son relativamente nuevos en psiquiatría, hay hallazgos particularmente interesantes, bastante literatura acerca de los efectos de la interacción gen-ambiente sobre diversos trastornos, así como sobre diversos métodos o mecanismos de búsqueda de interacciones gen-ambiente (estudios de genética clásica, de epigenética, modelos animales, neuroimagen funcional).

Las primeras evidencias de interacción GxE sobre comportamiento fueron reportadas en un par de artículos publicados en 2002 y 2003 por Caspi et al. En ambos se analizaron de forma prospectiva y longitudinal datos de una cohorte de nacimiento de Dunedin, Nueva Zelanda. Se comenzó con más de 1000 individuos que fueron seguidos durante más de 30 años. En el artículo de 2002 se reporta que un polimorfismo funcional en el gen que codifica para la enzima metabolizante del neurotransmisor monoamino oxidasa A (MAOA) moderaba el efecto del maltrato infantil. Los niños maltratados cuyo genotipo confería bajos niveles de expresión de MAOA, desarrollaban más frecuentemente trastornos de la conducta, personalidad antisocial y crímenes violentos en la edad adulta que aquellos niños con el genotipo MAOA de alta actividad [15]. En el artículo de 2003 se reporta que un polimorfismo funcional en el promotor del gen del transportador de serotonina (SERT o 5-HTT) moderaba la influencia de acontecimientos vitales estresantes (AVEs) en la depresión. Individuos con una o

dos copias del alelo corto (forma s) manifestaban más síntomas depresivos, depresión diagnosticable y tendencias suicidas tras AVEs que los individuos con dos copias del alelo largo (forma l) [17].

Como se ha visto, estos dos genes clave en la transmisión serotoninérgica están asociados de forma concluyente a distintas patologías mentales. Estas asociaciones fuertes también han sido encontradas por grupos independientes al de Caspi [73,76]. Destacamos un estudio de Cervilla et al. (2006, 2007) [19,20] en el que son replicados por primera vez en población española los hallazgos de Caspi et al. (2003).

Este tipo de estudios, aunque muy convenientes, también presentan limitaciones, algunas generales y otras más específicas dependiendo del tipo de metodología empleada. En general, la investigación de las interacciones gen-ambiente es difícil por la limitación en el rango de factores ambientales que se pueden estudiar, así como la escasez de instrumentos para medirlos; no obstante, hay una cosa clara, se requieren verdaderas colaboraciones entre los ámbitos de las neurociencias y la genética [14,16,30].

### **Otras estrategias**

Además de las aproximaciones ya repasadas que tratan de dilucidar parte de la etiología que subyace a los trastornos psiquiátricos, ahora se presentan brevemente otras alternativas que, aunque menos explotadas, tienen mucho que aportar.

- Anomalías cromosómicas estructurales: en el caso de enfermedades mendelianas raras, varias anomalías del tipo delección (caso del síndrome velocardiofacial) o translocación se han visto asociadas a síntomas psiquiátricos [22]. Esto ayuda en la localización de regiones donde podrían encontrarse genes candidatos [59]. De igual modo sucede con las mutaciones estructurales de novo, como por ejemplo en el caso del autismo [10].
- Modelos animales: principalmente para tener un punto de partida en las investigaciones sobre interacción gen-ambiente.

- Neuroimagen: esta técnica ha aportado buenos resultados como por ejemplo en el caso de la depresión mayor, donde se han identificado fenotipos de neuroimagen en el trastorno (aumento de lesiones hipertensas en la sustancia blanca o una atrofia del hipocampo) [23,24,48]. Otro tipo de estudios son los que implican el uso de resonancia magnética funcional (fMRI) [4,37]. Un enfoque consiste por ejemplo comparar respuestas de grupos de individuos con genotipos diferentes utilizando medidas de neuroimagen funcional [16].
- Epigenética: se está erigiendo como un puente capaz de conectar la biología y la salud mental. Se trata de una ciencia basada en el estudio de la forma en que los factores ambientales y estilos de vida pueden determinar la expresión de determinados genes. No solo los genes se heredan, también otros cambios del genoma que, sin alterar la secuencia de DNA y de forma reversible en muchos casos, determinan que un gen se exprese o no en función de condiciones ambientales [65].

## **Conclusiones**

Es muy poco probable que una única estrategia permita la identificación de todos los factores genéticos de riesgo, la clave para resolver todo es enigma no puede darse de forma individual e independiente. Debido a la naturaleza de los trastornos psiquiátricos, el peligro de centrar la atención en un único nivel es que es muy probable que se pierda gran cantidad de información [39].

La ineficacia para obtener y replicar resultados sólidos en la búsqueda de la etiología de los trastornos mentales, en muchos casos puede deberse a diversos factores como son el diseño del estudio, el pequeño tamaño de muestra o la estratificación de la misma, la poca exactitud en la definición del fenotipo, los criterios diagnósticos usados, la selección de los individuos de estudio para propósitos explícitos diferentes o la coexistencia o comorbilidad de otros trastornos psiquiátricos y/o somáticos. De todas formas, el avance sigue su curso, la comunidad científica se ha eco de tales limitaciones, y la mayoría de

estos aspectos están siendo tenidos en cuenta e investigados.

A pesar de que aún nos encontramos lejos de alcanzar esa posición privilegiada ante los problemas de salud mental, todos estos avances constituyen, sin duda, un buen comienzo. Como escribía Antonio Machado en uno de sus poemas: "... se hace camino al andar".

## **¿Y ahora qué?: Perspectivas de futuro**

Lo más importante es ser capaces de aunar fuerzas entre las distintas disciplinas que aspiran a destapar la etiología oculta de los trastornos psiquiátricos. Así avanzaremos más y más rápido.

### **Clasificación y diagnóstico**

Es necesario tratar de caracterizar y definir de forma exacta las enfermedades ante las que nos enfrentamos, añadiendo o eliminando subtipos si se requiriese; o incluso dar mayor relevancia en los estudios genéticos a los endofenotipos, que pueden ayudar a delimitar los subgrupos genéticos reales, y por tanto los factores genéticos implicados, tras un diagnóstico categórico. Debido a que estos fenotipos básicos probablemente existen a nivel celular, se está pensando recientemente en el uso de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas de neuronas y/o neuronas inducidas de fibroblastos para comprender mejor diversos aspectos de los trastornos psiquiátricos [9].

Debido a la naturaleza compleja de las enfermedades mentales, tanto ahora como en el futuro es delicada la aplicación de tests genéticos para diagnóstico [42]. Es más probable que la identificación de genes de susceptibilidad nos ayude a comprender mejor los procesos que guían al comienzo de la enfermedad, para así poder desarrollar tests bioquímicos, que en principio serían más baratos, rápidos y sencillos [54].

## **Desarrollo de nuevos y mejores tratamientos**

En el campo de la farmacología, la identificación de genes de riesgo, a largo plazo, proporcionará nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos [47,55]. La identificación de nuevas rutas biológicas implicadas en las enfermedades, conducirá al desarrollo de nuevas terapias y al progreso de la medicina personalizada.

En este punto es importante destacar la farmacogenética, cuyo empleo permitirá en muchos casos predecir la probabilidad de un individuo, según su perfil genético, de responder de forma adecuada o no a determinados fármacos [1]. Esta aplicación ya es una realidad, que en el caso de una empresa del País Vasco se traduce en un test de farmacogenética llamado Brainchip. La idea reside en adaptar el tratamiento farmacológico de los trastornos psiquiátricos al perfil genético del paciente, lo que servirá para aumentar la eficacia de los tratamientos antidepresivos y antipsicóticos [8].

Además, hacer una pequeña mención a la terapia génica o transferencia de material genético en un individuo con finalidad terapéutica [66]. Dada la complejidad de las enfermedades mentales, en un principio resultaría curioso pensar en la terapia génica como una nueva aproximación al tratamiento. Sin embargo, lo esencial es mirar en la dirección adecuada, como han hecho Bortolozzi et al. Mediante la administración a ratones de RNA pequeño de interferencia o siRNA reduce en gran medida el feedback negativo mediado por autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>, consiguiendo una mayor liberación de serotonina y efecto antidepresivo [7].

## **Mejora de las medidas preventivas**

Al igual que la predicción de la probabilidad de padecer un trastorno es limitada en estas enfermedades, también lo es el potencial preventivo. Además, no siempre es posible evitar los factores ambientales que intervienen en el

desarrollo del trastorno. Aún así, ahora que la incorporación de factores ambientales a los estudios de genética psiquiátrica está más avanzada, es lógico pensar en las potenciales medidas preventivas.

*“La solución no pasa por una batalla entre los diversos enfoques, sino por una visión más matizada y sofisticada de las múltiples perspectivas que pueden aportar luz a la etiología de los trastornos mentales” [25].*

## **Referencias**

1. Adkins DE, Clark SL, Aberg K, Hettema JM, Bukszár J, McClay JL et al.: Genome-wide pharmacogenomic study of citalopram-induced side effects in STAR\*D. *Transl Psychiatry* 2012, 2:e129.
2. Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G: A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. *Mol Psychiatry* 2003, 8:574-591.
3. American Psychological Association [online]. Disponible en <<http://www.apa.org/topics/index.aspx>>
4. Arnone D, McKie S, Elliot R, Thomas EJ, Downey D, Juhasz G et al.: Increased Amygdala Responses to Sad But Not Fearful Faces in Major Depression: Relation to Mood State and Pharmacological Treatment. *Am J Psychiatry* 2012, 168(8):841-850.
5. Baca E: Medicina genómica y Psiquiatría. En: Segovia JM, Mora F, Ochoa y la medicina clínica. Madrid: Farmaindustria Serie Científica; 2004. P. 117-131.
6. Badner JA, Koller D, Foroud T, Edenber H, Nurnberger Jr JI, Zandi PP et al.: Genome-wide linkage analysis of 972 bipolar pedigrees using single-nucleotide polymorphisms. *Mol Psychiatry* 2012, 17:818-826.
7. Bortolozzi A, Castañé A, Sernakova J, Santana N, Alvarado G, Cortés R et al.:

- Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors evokes strong anti-depressant-like effects. *Mol Psychiatry* 2012, 17(6):612-623.
8. BRAINco [online]. Disponible en <<http://brainco.es/es/que-es-brainchip#productos>>
9. Brennand KJ, Simone A, Tran N, Gage FH: Modeling psychiatric disorders at the cellular and network levels. *Mol Psychiatry* 2012, 17:1239-1253.
10. Burmeister M, McInnis MG, Zöllner S: Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nature Reviews Genetics* 2008, 9:527-540.
11. Byrne M, Agerbo E, Mortensen PB: Family history of psychiatric disorders and age at first contact in schizophrenia: an epidemiological study. *Br J Psychiatr* 2002, 181(43):s19-s25.
12. Cannon TD, Mednick SA, Parnas J: Two pathways to schizophrenia in children at risk. En Dick 2011, p. 387.
13. Cannon TD, Mednick SA, Parnas J, Schulsinger F, Praestholm J, Vestergaard A: Developmental brain abnormalities in the offspring of schizophrenic mothers. I. Contributions of genetic and perinatal factors. *Arch Gen Psychiatry* 1993, 50:551-564.
14. Caspi A, Hariri AR, Holmes A, Uher R, Moffitt TE: Genetic Sensitivity to the Environment: The Case of the Serotonin Transporter Gene and Its Implications for Studying Complex Diseases and Traits. *Am J Psychiatry* 2010, 167(5):509-527.
15. Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW et al.: Role of Genotype in the Cycle of Violence in Maltreated Children. *Science* 2002, 297(5582):851-854.
16. Caspi A, Moffitt TE: Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience* 2006, 7:583-590.
17. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H et al.: Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003, 301(5631):386-389.
18. Cervilla JA, García-Ribera C: *Fundamentos biológicos en psiquiatría*. Barcelona: Ed. Masson; 2000.
19. Cervilla JA, Molina E, Rivera M, Torres-González F, Bellón JA, Moreno B et al.: The risk for depression conferred by stressful life events is modified by variation at the serotonin transporter 5HTTLPR genotype: evidence from the Spanish PREDICT-Gene cohort. *Mol Psychiatry* 2007, 12:748-755.
20. Cervilla JA, Rivera M, Molina E, Torres-González F, Bellón JA, Moreno B et al.: The 5HTTLPR genotype at the serotonin transporter gene (SLC6A4) increases the risk for depression in a large cohort of primary of primary care attendees: The PREDICT-Gene Study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006, 141B:912-917.
21. Chial H: Polygenic inheritance and gene mapping. *Nature Education* 2008,

- 1(1).
22. Clancy A, Shaw KM: DNA deletion and duplication and the associated genetic disorders. *Nature Education* 2008, 1(1).
  23. Cole J, Chaddock CA, Farmer AE, Aitchison KJ, Simmons A, McGuffin P et al.: White matter abnormalities and illness severity in major depressive disorder. *BJP* 2012, 201:33-39.
  24. Colloby SJ, Firbank MJ, Thomas AJ, Vasudev A, Parry SW, O'Brien JT: White matter changes in late-life depression: a diffusion tensor imaging study. *J Affect Disorders* 2011, 135:216-220.
  25. Consejo General de la Psicología de España [online]. Disponible en <[http://www.infocop.es/view\\_article.asp?id=4048](http://www.infocop.es/view_article.asp?id=4048)>
  26. Cornblatt BA, Malhotra AK: Impaired Attention as an Endophenotype for Molecular Genetics Studies of Schizophrenia. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatric Genetics* 2001, 105:11-15.
  27. Craig J: Complex diseases: Research and applications. *Nature Education* 2008, 1(1).
  28. Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML: Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 2011, 12:499-510.
  29. De los Campos G, Gianola D, Allison DB: Predicting genetic predisposition in humans: the promise of whole-genome markers. *Nature Reviews Genetics* 2010, 11:880-886.
  30. Dick DM: Gene-Environment Interaction in Psychological Traits and Disorders. *Annu Rev Clin Psychol* 2011, 7:383-409.
  31. Duan J, Sanders AR, Gejman PV: Genome-wide approaches to schizophrenia. *Brain Research Bulletin* 2010, 83:93-102.
  32. Eaton WW, Martins SS, Nestadt G, Bienvenu OJ, Clarke D, Alexandre P: The Burden of Mental Disorders. *Epidemiol Rev* 2008, 30:1-14.
  33. Gershon ES, Alliey-Rodriguez N, Liu C: After GWAS: Searching for Genetic Risk for Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Am J Psychiatry* 2011, 168:253-256.
  34. Girard SL, Xiong L, Dion PA, Rouleau GA: Where are the missing pieces of the schizophrenia genetics puzzle? *Current Opinion in Genetics & Development* 2011, 21:310-316.
  35. Gottesman II, Gould TD: The Endophenotype Concept in Psychiatry: Etymology and Strategic Intentions. *Am J Psychiatry* 2003, 160:636-645.
  36. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC: *Genética Moderna*. 1ª Ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, SAU; 2000.
  37. Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D et al.: Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science* 2002, 297:400-403.



38. Huang J, Perlis RH, Lee PH, Rush AJ, Fava M, Sachs GS et al.: Cross-Disorder Genomewide Analysis of Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Depression. *Am J Psychiatry* 2010, 167:1254-1263.
39. Hyman SE: The genetics of mental illness: implications for practice. *Bulletin of the World Health Organization* 2000, 78(4):455-463.
40. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10) Version for 2010 [online]. Disponible en <<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/V>>
41. Junta de Andalucía, Consejería de Salud y Bienestar social [online]. Disponible en <<http://www.1decada4.es/>>
42. Kapur S, Phillips AG, Insel TR: Why has it taken so long for biological psychiatry to develop clinical tests and what to do about it? *Mol Psychiatry* 2012, 17:1174-1179.
43. Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ: A test of the equal-environment assumption in twin studies of psychiatric illness. *Behav Genet* 1993. 23(1):21-27.
44. Krishnan KR: Psychiatric disease in the genomic era: rational approach. *Mol Psychiatry* 2005, 10:978-984.
45. Kwok P, Chen X: Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol* 2003, 5:43-60.
46. Lobo I: Multifactorial inheritance and genetic disease. *Nature Education* 2008, 1(1).
47. Malhotra AK, Zhang J-P, Lencz T: Pharmacogenetics in psychiatry: translating research into clinical practice. *Mol Psychiatry* 2012, 17:760-769.
48. McKinnon MC, Yucel K, Nazarov A, MacQueen GM: A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volumen in patients with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2009, 34(1):41-54.
49. Merikangas KR, Swendsen JD: Genetic Epidemiology of Psychiatric Disorders. *Epidemiol Rev* 1997, 19(1):144-155.
50. Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR: Intermediate phenotypes and genetic mechanisms of psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 2007, 7:818-827.
51. Moffitt TE, Caspi A, Rutter M: Strategy for investigating interactions between measured genes and measured environments. *Arch Gen Psychiatry* 2005, 62:473-481.
52. Noticias Cuatro [online]. Disponible en <[http://www.cuatro.com/noticias/sociedad/Douglas\\_Coleman-Jeffrey\\_Friedman-Fundacion\\_BBVA-Fronteras\\_del\\_Conocimiento-Biomedicina-leptina-obesidad\\_2\\_1548780113.html](http://www.cuatro.com/noticias/sociedad/Douglas_Coleman-Jeffrey_Friedman-Fundacion_BBVA-Fronteras_del_Conocimiento-Biomedicina-leptina-obesidad_2_1548780113.html)>
53. Novo FJ: *Genética Humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina*. Madrid: Pearson-Prentice Hall;

- 2007.
54. Nuffield Council on Bioethics [online]. Disponible en <<http://www.nuffieldbioethics.org/mental-disorders/mental-disorders-chapter-downloads>>
  55. Philips S, Rae JM, Oesterreich S, Hayes DF, Stearns V, Henry NL et al.: Whole genome amplification of DNA for genotyping pharmacogenetics candidate genes. *Frontiers in Pharmacology* 2012, 3:1-4.
  56. Rakyán VK, Down TA, Balding DJ, Beck S: Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nature Reviews Genetics* 2011, 12:529-541.
  57. Ralston A: Gene interaction and disease. *Nature Education* 2008, 1(1).
  58. Real Academia Española: Diccionario de la Lengua Española (2 Vols.). 22<sup>a</sup> Ed. Madrid: RAE – Espasa Calpe; 2001.
  59. Rietschel M, Mattheisen M, Degenhardt F, Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP Investigators), Mühleisen TW, Kirsch P et al.: Association between genetic variation in a region on chromosome 11 and schizophrenia in large samples from Europe. *Mol Psychiatry* 2012, 17:906-917.
  60. Risch N, Merikangas K: The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996, 273(5281):1516-1517.
  61. Rivera-Sánchez M: Interacciones genético-ambientales y riesgo de depresión – Análisis transversal del Estudio PREDICT-Gene [tesis doctoral]. Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría: Universidad de Granada; 2008.
  62. Rucker JJH, Breen G, Pinto D, Pedroso I, Lewis CM, Cohen-Woods S et al.: Genome-wide association analysis of copy number variation in recurrent depressive disorder. *Mol Psychiatry* 2013, 18:183-189.
  63. Sanders AR, Duan J, Levinson DF, Shi J, Hou C, Burrell GJ, Rice JP et al.: No significant Association of 14 Candidate Genes With Schizophrenia in a Large European Ancestry Sample: Implications for Psychiatric Genetics. *Am J Psychiatry* 2008, 165:497-506.
  64. Shih RA, Belmonte PI, Zandi PP: A review of the evidence from family, twin and adoption studies for a genetic contribution to adult psychiatric disorder. *Int Rev Psychiatr* 2004, 16(4):260-283.
  65. Simmons D: Epigenetic influences and disease. *Nature Education* 2008, 1(1).
  66. Sociedad Española Terapia Génica y Celular [online]. Disponible en <<http://www.setgyc.es/index.php/ES/informacion-de-interes/introduction-to-gene-therapy>>
  67. Stoltenberg SF, Burmeister M: Recent progress in psychiatric genetics—some hope but no hype. *Hum Mol Genet* 2000, 9(6): 927-935.
  68. Sullivan PF, Daly MJ, O'Donovan M: Genetic architectures of psychiatric

- disorders: the emerging picture and its implications. *Nature Reviews Genetics* 2012, 13:537-551.
69. Sullivan PF: The Psychiatric GWAS Consortium: Big Science Comes to Psychiatry. *Neuron* 2010, 68(2):182-186.
70. Tenesa A, Haley CS: The heritability of human disease: estimation, uses and abuses. *Nature Reviews Genetics* 2013, 14:139-149.
71. The Psychiatric GWAS Consortium Steering Committee: A framework for interpreting genome-wide association studies of psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* 2009, 14:10-17.
72. Thomas D: Gene-environment-wide association studies: emerging approaches. *Nature Reviews Genetics* 2010, 11:259-272.
73. Uher R, McGuffin P: The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the etiology of depression: 2009 update. *Mol Psychiatry* 2012, 15:18-22.
74. Van der Sluis S, Posthuma D, Nivard MG, Verhage M, Dolan CV: Power in GWAS: lifting the curse of the clinical cut-off. *Mol Psychiatry* 2013, 18:2-3.
75. Van Dongen J, Slagboom PE, Draisma HHM, Martin NG, Boomsma DI: The continuing value of twin studies in the omics era. *Nature Reviews Genetics* 2012, 13:640-653.
76. Van IJzendoorn MH, Belsky J, Bakermans-Kranenburg MJ: Serotonin transporter genotype 5HTTLPR as a marker of differential susceptibility? A meta-analysis of child and adolescent gene-by-environment studies. *Trans Psychiatry* 2012, 2:e147.
77. World Health Organization: The Global Burden of Disease: 2004 Update. Ginebra: WHO; 2008.

## Capítulo 10

# **Genética, ambiente y riesgo para depresión: principales resultados y controversias**

**E. Molina  
B. Gutiérrez  
J. A. Cervilla**



# Genética, ambiente y riesgo para depresión: principales resultados y controversias

Esther Molina 1, 2, 3§, Blanca Gutiérrez 1, 2, 3 y Jorge A. Cervilla 1, 2, 3, 4 .

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

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

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

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

§ Corresponding author Email addresses: emrivas@ugr.es, BG: blancag@ugr.es, JC: jacb@ugr.es

*INTRODUCCIÓN: La depresión es un trastorno psiquiátrico muy prevalente y discapacitante, con una etiología multifactorial, donde factores de riesgo psicosociales y biológicos interaccionan entre sí para dar lugar al fenotipo final de enfermedad.*

*OBJETIVO: Revisar, de forma crítica, la bibliografía existente acerca de la posible interacción entre la carga genética individual y la adversidad ambiental en depresión, para obtener una visión general de los actuales resultados y controversias alrededor de esta cuestión.*

*METODOLOGÍA: Se revisaron los estudios observacionales realizados sobre humanos que han explorado la posible interacción entre genes de proteínas clave en depresión y factores ambientales de riesgo para la enfermedad. Además, se incluyeron, estudios realizados desde otros campos de investigación (neurociencia experimental, neuroimagen, a nivel celular, sobre roedores o primates no humanos).*

*RESULTADOS: A pesar de la discrepancia en los resultados, existe cierta evidencia a favor de la existencia de una interacción gen-ambiente en depresión, sobre todo para el alelo S del polimorfismo 5-HTTLPR del gen del transportador de serotonina (gen SERT) y variables de adversidad ambiental, tales como los acontecimientos vitales estresantes (AVEs) y las experiencias de maltrato en la infancia, aunque más investigaciones son necesarias.*

*CONCLUSION: Las futuras investigaciones deben ser metodológicamente más minuciosas, con una exhaustiva evaluación de la adversidad ambiental y del fenotipo depresivo y con un diseño longitudinal que permita establecer relaciones de causalidad.*

## **1.Introducción**

*“Llorando más allá de lo debido, con ese inmenso dolor te vas marchitando, sin que tu llanto se vea como solución a la desgracia” (Sófocles, 496-406 a.C. Grecia).*

La tristeza es un sentimiento presente en algunos momentos de nuestra vida, aunque, en la mayoría de los casos, se trata de un estado transitorio. Sin embargo, en algunas personas se instaura una tristeza profunda, de difícil expresión por parte de quien la padece y que se mezcla con pensamientos negativos y con sentimientos de culpa, que hacen que la persona se sienta abatida y que pierda las ganas de vivir.

La depresión mayor se define como un trastorno afectivo caracterizado por hipotimia (un estado de ánimo anormalmente bajo), anhedonia (pérdida de interés y de la capacidad de obtener placer con las cosas) y fatigabilidad, acompañados de otros síntomas, como alteraciones del sueño, sensación de pérdida de energía, disminución de la capacidad para pensar, concentrarse o tomar decisiones, sentimientos de infravaloración y culpa o pensamientos de muerte. Todos estos síntomas interfieren gravemente con las actividades de la vida diaria del individuo generando discapacidad [3].

La depresión es, a día de hoy, el trastorno psiquiátrico más frecuente en países desarrollados, con tasas de prevalencia descritas en torno al 7% en población general [77] , siendo España uno de los países de Europa con mayor prevalencia de esta enfermedad (18% en mujeres y 11% en hombres) [81] . Es además, un trastorno muy recurrente [5] y una de las enfermedades más discapacitantes en el mundo desarrollado [126], por lo que genera altos costes a la Comunidad [126].

Por todo ello, reducir la prevalencia de depresión en la población, mediante el desarrollo de estrategias de prevención del trastorno, se ha convertido en un reto para el siglo XXI, para cuya consecución se hace necesario conocer a fondo cuáles son y en qué medida actúan los factores que aumentan el riesgo de desarrollar esta enfermedad, para así poder evitar que impacten sobre el individuo y provoquen la enfermedad.

## **2. Etiología de la Depresión**

La etiología de la depresión está, a día de hoy, aún lejos de ser totalmente conocida, aunque sí podemos afirmar que es compleja y multifactorial, en donde existen factores de riesgo de tipo psicológico, social y biológico que no actúan por separado, sino que interaccionan entre sí para predisponer, desencadenar o perpetuar el trastorno.

En primer lugar, parece existir una predisposición psicológica a padecer depresión.

Ciertos rasgos neuróticos de personalidad o unos bajos niveles de tolerancia al estrés se encuentran entre los factores de riesgo de tipo psicológico que podrían sensibilizar al individuo frente a determinados acontecimientos vitales, que otro tipo de personalidad no encontraría estresantes, frente a los cuales respondería con comportamientos y conductas “negativas” que, mantenidas a lo largo de la vida, les predispondría a la enfermedad [128, 19, 66].

En segundo lugar, numerosos autores han descrito factores de riesgo de tipo social que aumentan el riesgo de padecer depresión o de perpetuar el trastorno.

Aquellos acontecimientos vitales que ocurrieron en la infancia, tales como la privación materna o el abuso de tipo físico, sexual o psicológico, pueden tener su influencia en la edad adulta, provocando la formación de conexiones a nivel celular y neuroquímico entre ciertas emociones y cogniciones que podrían ser, después, evocadas por mínimos estímulos ambientales, reactivándose de una forma desproporcionada y provocando, finalmente, la enfermedad [51, 135, 94, 137].

Además, entre los factores de riesgo para depresión de tipo social, los acontecimientos vitales estresantes (AVEs) se han sugerido como posibles desencadenantes del trastorno depresivo. La muerte de un familiar, dificultades de pareja, el padecimiento de una enfermedad, entre otros, constituyen fenómenos externos bruscos, que producen desadaptación social y estrés psicológico y que son percibidos como una amenaza por el sujeto sobre el que recaen [26].

Otros factores de riesgo de tipo social descritos para depresión y que suelen hacer que se la enfermedad se instaure de forma recurrente, son el tener un deficiente apoyo social que amortigüe situaciones de estrés [108].



Durante las últimas décadas los investigadores han dedicado sus esfuerzos a intentar comprender cómo estos factores etiológicos de tipo psicosocial se combinan para dar lugar a la enfermedad. Así, se han elaborado distintos modelos predictivos de depresión con el objetivo de integrar tales factores, explicar las relaciones existentes entre ellos y profundizar en la etiología de esta enfermedad. Un ejemplo de ello es el modelo PREDICT-D [82], que predice la aparición de depresión en los siguientes 12 meses, con una probabilidad de acierto muy elevada y comparable a la del modelo predictivo de riesgo cardiovascular desarrollado por Anderson y cols., en el año 1991 [4], por lo que supone una herramienta predictiva de depresión equiparable a dicho modelo, tan utilizado actualmente.

Sin embargo, en la mayoría de los casos, los modelos predictivos de depresión elaborados hasta el momento, incluido el modelo PREDICT-D, han estado más centrados en el componente psicosocial del trastorno, dejando a un lado las evidencias existentes a favor de la existencia de unas bases biológicas en el origen de la enfermedad.

### **3. Bases biológicas de la depresión**

No es difícil percatarnos de que no todos los individuos son igualmente vulnerables al efecto de riesgo conferido por un ambiente desfavorable. En efecto, como ya se ha comentado, la personalidad premorbida juega un importante papel en cómo nos enfrentamos a los avatares de la vida, pero, además, existen otras características intrínsecas del individuo que lo harán más o menos vulnerable a padecer depresión.

Así, se ha sugerido la existencia de unas bases biológicas del trastorno depresivo que tienen que ver con alteraciones endocrinas y neuroquímicas y con la carga genética individual.

Existen evidencias que apuntan a que ciertas alteraciones en los mecanismos de adaptación al estrés estarían involucradas en el desarrollo, tratamiento y prevención de los trastornos del humor.

El eje Hipotálamo-Hipofiso-Adrenal (eje HHA) es el sistema neuroendocrino fundamental en la respuesta al estrés. En el caso de una exposición mantenida al estrés, ésta provocaría una hiperactividad del eje HHA, dando lugar a respuestas excesivas o bien inadecuadas (en duración o en magnitud) cuyas consecuencias podrían estar relacionadas con el origen de la

depresión [68]. En este sentido, numerosos estudios han constatado, en pacientes deprimidos, una elevación de los niveles de cortisol y de factor liberador de corticotropina (CRF) [39]. Además, se ha observado que unas concentraciones elevadas de glucocorticoides, mantenidas en el tiempo, pueden dañar las neuronas del hipocampo, impidiendo la neuroprotección y la neurogénesis en este área, lo cual provocaría una reducción de la retroalimentación negativa sobre el eje HHA [38]. De este modo, en estos individuos parece existir una incapacidad de su sistema hipotálamo-hipófiso-adrenal para suprimir el cortisol plasmático y, como consecuencia, una hiperactividad de este eje, lo cual, a su vez, provocaría una hiperactivación del sistema simpático-adrenal y una alteración del sistema serotoninérgico [39].

Algunos autores han demostrado un efecto del estrés mantenido sobre vías de neurotransmisión serotoninérgica, disminuyendo la concentración de serotonina en el espacio intersináptico [102].

La serotonina está implicada en la regulación del estado de ánimo, el sueño, la agresividad o el apetito, funciones estas que se encuentran afectadas en los individuos deprimidos.

La idea de la implicación de la serotonina y otras monoaminas en la fisiopatología de la depresión queda expresada en la hipótesis monoaminérgica. Ésta centra la fisiopatología de la depresión en una deficiencia de los neurotransmisores serotonina, noradrenalina y/o dopamina en zonas del cerebro tales como la amígdala (que controla las emociones y el humor), el hipotálamo (responsable del sueño, la libido) o la corteza cerebral (implicada en procesos cognitivos superiores), estructuras estas que se encuentran afectadas en individuos deprimidos [93].

Tal idea surge en los años 50 cuando se observó una mejora sustancial en los síntomas de pacientes depresivos a los que se les había administrado drogas que provocaban una elevación de las concentraciones de monoaminas en el espacio presináptico [10]. Posteriores investigaciones apoyaron la implicación de los sistemas serotoninérgico [143, 6, 8], noradrenérgico[121] y dopaminérgico[85] en la fisiopatología de la depresión.

#### **4. Bases genéticas de la depresión**

Desde un punto de vista molecular, es obvio que estos sistemas de neurotransmisión monoaminérgica que parecen estar alterados en el trastorno

depresivo, están formados por moléculas que son codificadas por genes cuya variabilidad poblacional podría tener algo que decir en el origen de la enfermedad.

La primera idea de que la etiología del trastorno depresivo podría tener un componente genético vino de la observación de cierta agregación familiar.

Estudios epidemiológicos de familia, que estudian la prevalencia el trastorno en entre sus miembros, han evidenciado la existencia de un riesgo de padecer depresión en torno a tres veces superior entre los familiares de primer grado de pacientes deprimidos, en comparación con la población general [90]. Por su parte, los estudios realizados sobre individuos adoptados y sobre gemelos describen tasas de heredabilidad en torno al 40%, lo que significa que el 40% de la variabilidad del trastorno sería atribuible a factores genéticos [97].

Con el rápido avance de las técnicas de Biología Molecular, ha sido posible desarrollar estudios genéticos de ligamiento y asociación, con el objetivo de identificar dónde se encuentran localizados y cuáles son los genes que parecen estar jugando un importante papel en el origen de la depresión.

Debido a las evidencias a favor de una hipótesis monoaminérgica en la etiología de la depresión, los investigadores han dirigido sus análisis hacia genes que codifican proteínas con un importante papel en la neurotransmisión serotoninérgica, dopaminérgica, noradrenérgica o gabaérgica.

Los principales hallazgos desde los estudios en Genética Psiquiátrica señalan al gen que codifica para el el transportador de serotonina (gen SERT) como uno de los más fuertemente asociados a depresión [92].

Este gen presenta un polimorfismo funcional de tipo VNTR en su zona promotora, con dos alelos posibles (S o corto y L o largo) muy frecuentes en la población. El alelo S ha sido asociado con una menor eficiencia transcripcional del gen [89] y, por tanto, con una menor disponibilidad de proteína transportadora que recapte serotonina desde el espacio intersináptico de vuelta a la neurona presináptica, lo cual determina una mayor concentración de serotonina en el espacio intersináptico.

Numerosos estudios de asociación génica en muestras independientes han descrito riesgos incrementados para padecer depresión en los individuos con el genotipo S/S de este polimorfismo [33, 56, 28], aunque no faltan los estudios que no han replicado estos resultados [123, 141]. Los metanálisis realizados hasta el momento parecen ir más a favor de la existencia de tal asociación [92], aunque otros sugieren que el alelo S se encuentra más bien

asociado a trastorno bipolar, y no tanto a depresión mayor [87]. Con todo, el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT es a día de hoy el más estudiado en relación a depresión.

Por otra parte, los investigadores han dirigido la búsqueda de genes implicados en la etiología de la depresión, además, hacia otros genes del sistema serotonérgico (tales como los que codifican receptores de serotonina, genes HTR1A, HTR2A o HTR2C), genes del sistema dopaminérgico (como el gen que codifica para el transportador de dopamina, gen DAT, o genes de los receptores de dopamina, genes DRD3 y DRD4, entre otros) o hacia genes del metabolismo de neurotransmisores (tales como el gen que codifica para la enzima monoamino-oxidasa A, gen MAOA, o el gen del enzima limitante de la síntesis de dopamina tirosina hidroxilasa, gen TH).

Sin embargo, los hallazgos de asociación de todos estos genes con depresión no han sido del todo replicados, y, salvo quizá en el caso del polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT, no existen a día de hoy resultados concluyentes acerca de qué genes podrán estar implicados en el origen de esta enfermedad [133].

La falta de consistencia en los resultados derivados de los estudios de genética cuantitativa podría ser debida a la dificultad en la definición del fenotipo depresivo. Lo cierto es que no existen parámetros biológicos que definan los límites de la enfermedad o los subtipos o categorías que pudieran existir dentro de ésta, por lo que la clasificación se centra, fundamentalmente, en criterios clínicos que no siempre reflejan una realidad biológica.

Otra de las posibles razones podría ser el uso de tamaños muestrales reducidos que no aportan el poder estadístico suficiente para explorar en profundidad un trastorno complejo cuyas bases genéticas, probablemente, no son atribuibles a un gen concreto responsable, sino más bien al efecto pequeño de numerosos genes que, además, interactúan entre sí, mediante relaciones de epistasis (interacción gen-gen), y también con el ambiente (interacción genético-ambiental), haciendo muy difícil definir el modelo de herencia de la enfermedad [74].

## **5. Interacción genético ambiental en Depresión**

Como se ha comentado, las investigaciones sobre los factores genéticos en los trastornos mentales que se han llevado a cabo en las últimas décadas,

han mostrado la discrepancia existente entre las altas tasas de heredabilidad estimadas desde los estudios de genética clásica y la escasez de resultados genéticos que identifiquen genes candidatos para depresión de manera concluyente [133].

Una de las posibles explicaciones es que los genes implicados no actuarían de forma independiente ni directamente sobre la etiología de la enfermedad, sino más bien interaccionando entre ellos (interacción gen-gen) y con el ambiente (interacción gen-ambiente), modulando así el riesgo conferido por determinados factores de tipo ambiental. Así, multitud de genes estarían potenciando o atenuando el efecto modulador que otros muchos genes ejercerían sobre el ambiente, para dar lugar al fenotipo final de enfermedad.

Esta podría ser la razón por la que los estudios de asociación genética, hasta ahora, han producido resultados no del todo concluyentes. El hecho de que un gen no haya sido del todo asociado a la enfermedad de interés, no implica necesariamente que ese gen no juegue un papel en la etiología de tal carácter, ya que éste puede estar actuando a través de su interacción con factores ambientales que, si no son tomados en cuenta, pudieran enmascarar su efecto [100].

De este modo, podemos definir la interacción genético-ambiental como una situación en la que el riesgo conferido por la exposición a un factor ambiental varía en función de la carga genética del individuo [147].

Así, podríamos afirmar que la depresión sería el resultado de la interacción de factores de distinta naturaleza y que, por tanto, los acontecimientos estresantes raramente son los únicos responsables de la aparición del episodio depresivo, sino que, más bien, ejercen su acción sobre la predisposición intrínseca de cada individuo (personalidad, neuroquímica, carga genética), lo que provoca el aumento de los niveles de vulnerabilidad hasta la aparición de la enfermedad.

Algunas de las investigaciones en Psiquiatría Genética, realizadas en las últimas décadas, comienzan a incluir esta visión integradora entre el componente genético y el ambiental en el abordaje de la etiología de la enfermedad mental. En esta nueva aproximación genético-ambiental, la enfermedad mental se produciría como resultado de la interacción entre intrincadas redes de cientos o miles de genes y múltiples factores ambientales, dando lugar al fenotipo final de enfermedad [59].

## **5.1 Interacción gen del transportador de serotonina y adversidad ambiental en Depresión**

La importancia de la carga genética individual en la respuesta al estrés ambiental en depresión ya se comenzó a constatar desde mediados de la década de los noventa, cuando Kendler y cols. documentaron un mayor riesgo de depresión, tras sufrir un acontecimiento estresante, en los individuos con una carga genética de riesgo, en comparación con aquéllos sin ese riesgo genético [75].

Sin embargo, no se conocía cuáles podrían ser los genes que modulaban el efecto de los acontecimientos vitales estresantes (AVEs) en la vulnerabilidad a padecer depresión.

Más adelante, surgieron algunas evidencias que apuntaban al gen que codifica para el transportador de serotonina (gen SERT) como uno de los genes candidatos para ejercer este efecto.

Así, Murphy y colaboradores, en el año 2001, describieron la existencia de una respuesta al estrés diferenciada en ratones knock-out para el gen SERT. Frente a un estímulo estresante, los ratones knock-out homocigotos (5HTT -/-) y heterocigotos (5HTT +/-), exhibían un comportamiento más atemorizado y mayores niveles de hormona adrenocorticotropina, en comparación con los animales controles (5HTT +/+) [104].

Posteriormente, en un estudio realizado sobre primates (Rhesus machaques) sometidos a estrés, se describió una función serotoninérgica disminuida (a través de una menor concentración de 5-hidroxiindol-acético en líquido cefalorraquídeo), en aquellos animales portadores del alelo S del polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT, respecto a los de genotipo L/L [16].

Por último, Hariri y colaboradores (2002), demostraron que los individuos portadores del alelo S, exhibían una exagerada actividad amigdalal en situaciones de miedo, en comparación con los individuos L/L, asociando así, por primera vez desde un estudio de neuroimagen funcional, el gen SERT con la respuesta al estrés [61].

Estos hallazgos sugerían que variaciones en el gen del transportador de serotonina podrían modular las reacciones psicopatológicas a acontecimientos estresantes, pero no fue hasta la publicación, en la prestigiosa revista Science, del estudio paradigmático de Caspi y cols. cuando se demostró, de forma empírica, la existencia de una interacción genético ambiental en depresión [24].

Se trata de un estudio de seguimiento longitudinal de una cohorte de 1037

individuos (52% hombres) de la misma edad, que fueron evaluados para toda una batería de variables socio-ambientales y psicológicas a las edades de 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 18, 21, 26 años.

La adversidad ambiental se evaluó previamente a generar el diagnóstico de depresión y a través de la experiencia de acontecimientos vitales estresantes (AVEs) en los últimos 5 años (relativos al empleo, la economía, la salud, las relaciones y el hogar) y mediante entrevistas estructuradas y validadas que fueron repetidas varias veces. Además se obtuvieron datos sobre maltrato en la infancia, que fueron verificados mediante fuentes externas.

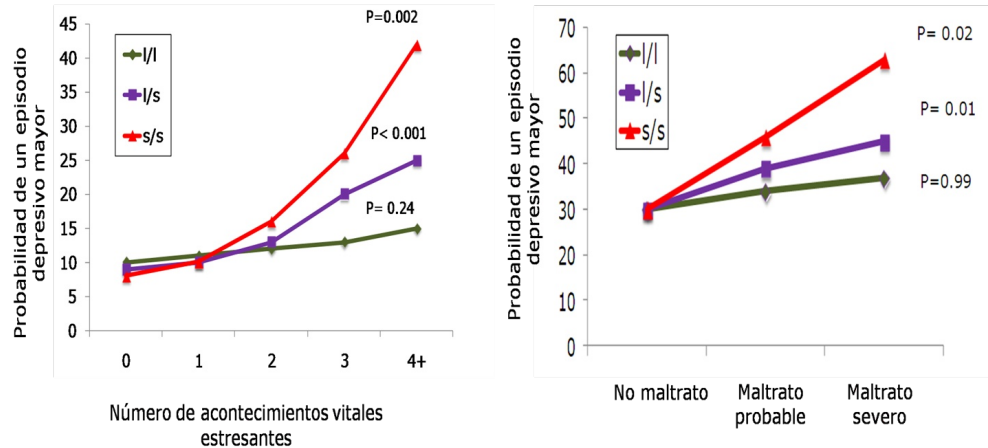
Por último, al final del seguimiento, los participantes fueron evaluados para depresión mayor (según criterios DSM-IV) en el último año, mediante la Diagnostic Interview Schedule [116].

Los resultados del estudio de Caspi y cols. mostraron, en primer lugar, la existencia de una asociación entre el número creciente de AVEs y un riesgo incrementado para padecer depresión ( $p < 0.001$ ), lo cual era un hallazgo esperable.

En segundo lugar, no encontraron ninguna asociación entre el polimorfismo 5HTTLPR del gen que codifica para el transportador de serotonina y depresión ( $p = 0.29$ ).

Sin embargo, cuando se valoró la posible interacción entre ese gen y los acontecimientos vitales estresantes, se encontró un efecto global estadísticamente significativo ( $p = 0.056$ ). Así, los individuos portadores del alelo corto (S), transcripcionalmente menos activo [89], tenían una mayor probabilidad de desarrollar depresión, después de sufrir acontecimientos vitales estresantes que aquellos individuos homocigotos para el alelo largo (L). Por genotipos, la significación aumentaba, de modo que los individuos doblemente portadores del alelo corto (S) del gen y que, además, acumulaban más acontecimientos vitales estresantes, eran los que presentaban un mayor riesgo para padecer depresión ( $p = 0.002$ ) (Ver Figura 1-a).

Por último, encontraron que el maltrato sufrido durante la infancia, incrementaba significativamente la probabilidad de desarrollar depresión en la vida adulta en aquellos individuos portadores del alelo corto (S), en comparación con los no portadores ( $p = 0.05$  para la interacción). (Ver Figura 1-b). Estos hallazgos demostraron, por primera vez, que el polimorfismo funcional 5-HTTLPR de la región promotora del gen SERT modula el efecto de riesgo conferido por la adversidad ambiental en depresión [24].



**Figura 1. Principales hallazgos de Caspi y cols., 2003. Probabilidad de episodio depresivo mayor en función del genotipo para el polimorfismo 5-HTTLPR del gen del transportador de serotonina (SERT) y el número de acontecimientos vitales estresantes (izquierda) ó de las experiencias de maltrato en la infancia (derecha). Figura modificada de Caspi y cols.,2003 [24]**

El trabajo de Caspi y cols. supuso una verdadera revolución en Psiquiatría Genética y no tardaron en surgir trabajos que replicaban sus hallazgos, aunque en muestras de gemelos [52, 76, 69, 31, 139, 35, ], de mujeres [45, 124, 31, 139], de niños [73, 72], de adolescentes [45, 29, 32], de estudiantes o profesores [34, 124, 129, 140], de ancianos [79, 110], de mujeres embarazadas [120 ], o de individuos deprimidos o bipolares [95].

En el año 2007, Cervilla y cols., replicaron los hallazgos de Caspi y su equipo, por primera vez, en una muestra de adultos amplia, representativa de la población general y en la que se habían usado herramientas estandarizadas y validadas para generar el diagnóstico de depresión y para evaluar la presencia de AVEs [27].

En este trabajo se describía que aquellos individuos con el genotipo s/s necesitaban haber sufrido un solo AVE para elevar sus niveles de riesgo para depresión a los mismos niveles que presentaban los individuos con otras combinaciones alélicas que habían sufrido más de dos AVEs.

La novedad de este estudio fue que esa interacción era independiente del efecto de posibles variables confusoras, tales como el sexo, la edad o la historia familiar de problemas psicológicos, y que fue el primer estudio que examinaba la existencia de una interacción genético-ambiental en depresión en una muestra española, con frecuencias genotípicas y prevalencias de exposición a AVEs similares a otras poblaciones europeas.



Sin embargo, desde la publicación del trabajo de Caspi y cols., no son escasos los autores que han fallado en encontrar evidencias de la existencia de una interacción entre 5HTTLPR y adversidad ambiental [52, 128, 29, 34, 110].

A la vista de esta discrepancia en los resultados publicados en la bibliografía científica, dos metanálisis fueron desarrollados, con el objetivo de dar una respuesta definitiva a la cuestión de si existe o no un efecto de interacción entre el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT, adversidad ambiental (AVEs) y depresión [103, 114].

El primero de los trabajos fue desarrollado por Munafo y cols. en 2009 [103]. y se trató de una revisión sistemática y un subsecuente metanálisis. Se incluyeron 14 estudios en la revisión, a pesar que existían 34 trabajos de interacción entre el gen SERT, AVEs y depresión publicados hasta ese momento. La razón fue que éstos debían cumplir unos criterios de inclusión relativos al modo de evaluación de los AVEs (que debía ser comparable a la realizada por Caspi y cols. [24].) y a que la variable dependiente fuera diagnóstico de depresión mayor.

Munafo y cols. identificaron en su revisión sólo dos replicaciones positivas [76, 79] y doce no replicaciones, a pesar que la mayoría de los estudios catalogados como no replicaciones mostraban una interacción GxE estadísticamente significativa [45, 54, 124, 69, 72, 130, 140, 27]. Para Munafo y cols., tales hallazgos eran metodológicamente poco comparables a los de Caspi y cols. y no constituían una verdadera replicación, ya que se habían descrito en submuestras (gemelos, mujeres, ancianos, etc) o diferían del trabajo original en el modo cómo se evaluó la adversidad ambiental, AVEs y maltrato, y la variable dependiente (por ejemplo, de forma autoinformada en Surtees y cols. 2006 [128] y de forma retrospectiva en Gillespie et al., 2005 [52]).

Debido a los estrictos criterios de inclusión, solo 5 de los 34 estudios disponibles fueron incluidos en el metanálisis de Munafo y su grupo [24, 45, 128, 79, 120] por ser éstos, a su juicio, los únicos comparables metodológicamente al estudio original de Caspi y cols.

Finalmente, concluyeron que los hallazgos positivos de interacción entre el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT, los AVEs y depresión eran comparables a los que pudieran darse por puro azar [103].

El segundo de los metanálisis que explora la interacción entre el gen SERT y AVEs en depresión publicados hasta el momento, fue desarrollado por Risch y cols., también en el año 2009 [114]. Incluyeron en sus análisis aquellos

estudios previos donde los AVEs se categorizaban de forma ordinal (0 AVE > 1 AVE > 2 AVEs  $\geq$  3 AVEs ) y donde la variable dependiente era dicotómica (presencia o ausencia de depresión mayor, utilizando los sistemas de clasificación DSM-IV y CIE-10, o mediante puntuaciones de corte en entrevistas estandarizadas). Así, de los 34 estudios publicados hasta ese momento, 14 cumplieron estos criterios de inclusión en el metanálisis. De ellos, sólo 3 fueron considerados como replicaciones del estudio original de Caspi y cols. [140, 27, 79] otros 3 se tomaron como replicaciones parciales [45, 54, 130] y 7 resultaron ser no replicaciones [52, 128, 29, 31, 99, 110, 86].

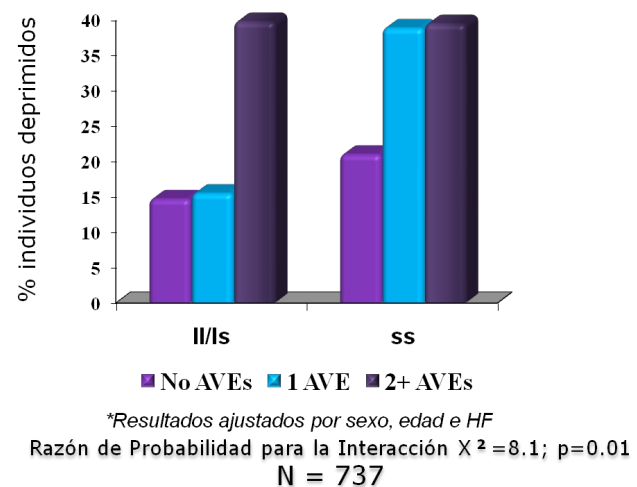
Risch y cols. concluyeron que no existía evidencia suficiente de la existencia de una interacción entre el gen SERT, los AVEs y depresión [114].

Numerosas han sido las voces de investigadores que han respondido en contra de estos metanálisis cuestionando la metodología utilizada en ellos [117, 71, 136, 83, 91, 122, 112, 113, 118, 132].

Así, según estos autores, los criterios de inclusión utilizados en ambos metanálisis parecen ser demasiados restrictivos.

En primer lugar, en cuanto al criterio basado en el modo en que se evaluó la variable dependiente (como diagnóstico de depresión mayor en Munafo y cols. [103] y como presencia o ausencia de depresión en Risch y cols. [114]), en ambos casos se excluyeron aquellos estudios que habían explorado sintomatología depresiva como una escala continua de síntomas depresivos.

En segundo lugar, en el caso de Risch y cols. [114], se incluyeron solo los trabajos en donde los AVEs se habían categorizado de forma ordinal, de modo que quedaron descartados aquellos trabajos donde se había evaluado el efecto de riesgo de un



**Figura 2. Interacción genético-ambiental entre las experiencias de acontecimientos vitales estresantes y el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT en depresión. Entre los individuos que han sufrido un solo acontecimiento estresante (AVE) existen significativamente mayor proporción de deprimidos con el genotipo S/S que individuos con otras combinaciones alélicas. Figura modificada de Cervilla y cols., 2007 [26].**

solo evento estresante. Por otra parte, en el trabajo de Munafo y cols. [103], el criterio de inclusión fue aceptar aquellos trabajos donde los AVEs se categorizaban en dos niveles: no expuesto (no tener ningún AVEs) o expuesto (haber sufrido uno o más AVEs).

Sin embargo, en el trabajo original de Caspi y cols. [24] no se encontró ningún efecto del gen SERT sobre el riesgo para depresión conferido por la presencia de un solo AVE. Es decir, todas las combinaciones alélicas posibles (S/S, S/L y L/L) tuvieron la misma probabilidad de padecer depresión debida al efecto de riesgo de un solo acontecimiento estresante. Fue a partir de dos o más AVEs cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas (Ver figura 1) entre los individuos portadores de diferentes genotipos [24]. Por tanto, agrupar a los individuos que presentan distinto número de AVEs en un único grupo de expuestos a adversidad ambiental, compromete el poder para detectar la posible interacción entre el polimorfismo 5-HTTLPR, AVEs y depresión en un metanálisis [71].

En tercer lugar, los estrictos criterios de selección de estudios previos utilizados en ambos metanálisis, parecen sesgar la muestra hacia una mayor presencia de trabajos que no han encontrado interacción genético-ambiental. En opinión de algunos investigadores, ésta no representaría una buena síntesis de la literatura actual en cuanto a la interacción gen SERT y AVEs en depresión [71, 132] ya que se tiende a la sobreexpresión de estudios negativos. Así, por ejemplo, Risch y cols. [114] incluyeron 7 de 9 estudios de no replicación, frente a 6 de 17 de los de replicación de los hallazgos originales. Munafo y cols. [103] incluyeron 3 de 4 estudios negativos y 2 de 10 de los positivos.

Finalmente, la mayor parte de estudios incluidos en estos metanálisis, usaron un modo autoinformado de evaluar las experiencias de AVEs, mientras que aquellos estudios que usaron medidas más objetivas para evaluar la adversidad ambiental, tales como las entrevistas estructuradas, fueron mayoritariamente descartados.

El modo en que se evalúa la adversidad ambiental es importante, porque es fuente de heterogeneidad metodológica en los trabajos existentes sobre interacción gen-ambiente y porque repercute directamente en los resultados de tales investigaciones, siendo preferible el uso de entrevistas estructuradas a los cuestionarios autoinformados [101, 98]. Así, Uher&McGuffin, 2010 [132] demostraron, por primera vez, que la mayoría de los trabajos en los que se usaron entrevistas estructuradas y objetivas para evaluar las experiencias de

AVEs, resultaron en replicaciones parciales o totales de los hallazgos de Caspi y cols., [24] y, por el contrario, las no replicaciones, se encontraban, predominantemente, entre los estudios que usaron cuestionarios autoinformados [132].

Probablemente la evaluación autoinformada no sea del todo adecuada para evaluar, de manera fiable, la presencia de acontecimientos estresantes de diferente magnitud que ocurrieron en el pasado, ya que, según las circunstancias, e incluso, el estado de ánimo del paciente en el momento de la entrevista, éste podría enfatizar acontecimientos adversos en circunstancias más tribales y, sin embargo, no dar demasiada importancia a eventos severos que pudieron ser claves en el origen de la depresión. Además, el individuo puede tener sesgos de memoria y no recordar de forma fiable estos eventos que ocurrieron hace cierto tiempo [132].

Precisamente, el método de evaluación de las variables ambientales emerge como una cuestión importante en un último metanálisis, recientemente publicado [70] y que se ha desarrollado con el objetivo de aclarar, de una vez por todas, la controversia generada en cuanto a la existencia o no de un efecto modulador por parte del polimorfismo 5-HTTLPR del ambiente en la aparición del trastorno depresivo.

En este trabajo, Karg y cols. [70], conscientes de la dificultad que implica aunar todos los estudios publicados hasta el momento que abordan la posible existencia de una relación entre el polimorfismo 5-HTTLPR, el estrés y la depresión, debido a sus diferencias metodológicas, han usado una aproximación estadística ampliamente utilizada y validada en estudios de bioestadística y genómica, denominada Liptak-Stouffer z score, que permite combinar los distintos valores de significación estadística (p-value) derivados de los diferentes estudios teniendo, además, en cuenta el tamaño muestral utilizado en cada trabajo [62].

En la Figura 3, tomada de Karg y cols., [70] los autores resumen los hallazgos publicados hasta ahora, e incluidos en su metanálisis, desde los estudios de interacción entre el polimorfismo 5-HTTLPR, el estrés ambiental y depresión. Así, cada uno de los p-values derivado de cada estudio se representa mediante un cuadrado, cuyo tamaño depende del tamaño muestral empleado en el trabajo en cuestión, y se sitúa en el eje de ordenadas dependiendo de su valor. Los menores valores en este eje corresponden a una mayor evidencia de modulación del efecto de riesgo del ambiente por parte del alelo S del

polimorfismo 5-HTTLPR.

De la Figura 3. se desprende que son mucho más numerosos los estudios a favor de la existencia de una vulnerabilidad al estrés en depresión modulada por la variabilidad contenida en el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT, que los que no encuentran este efecto de interacción genético ambiental.

Así, el metanálisis de Karg y cols. [70], encuentra fuertes evidencias a favor de que el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT modula la relación existente entre el estrés ambiental y depresión, con el alelo S asociado a niveles incrementados de depresión por el efecto del estrés ambiental, tanto en el análisis global de todos los estudios publicados hasta ese momento, como tras un análisis estratificado por tipo de estresor ambiental (acontecimientos vitales estresantes, salud física y maltrato).

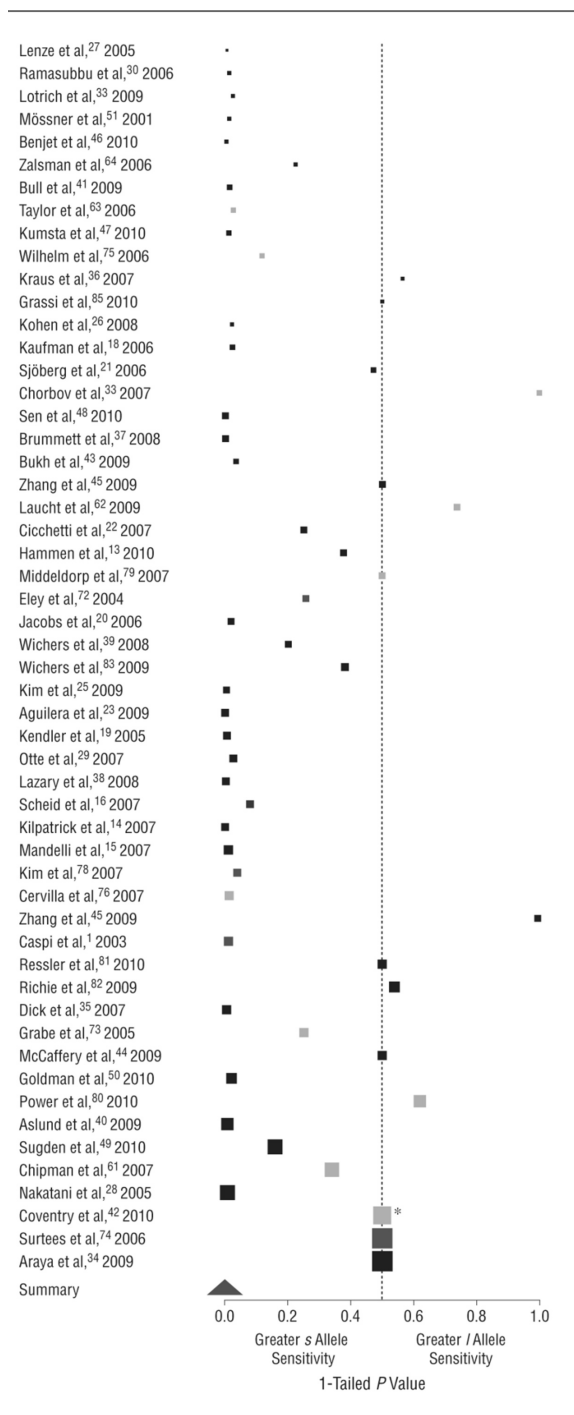
La evidencia más fuerte de interacción entre el polimorfismo 5-HTTLPR y el ambiente en depresión se producía en el caso de las experiencias de maltrato en la infancia ( $p\text{-value}=0.00007$ ) y no tanto con los AVEs ( $p\text{-value}=0.03$ ). Quizá esto sea debido a la variabilidad metodológica existente en los estudios previos en el modo en que se evalúan los eventos estresantes.

Tras llevar a cabo un análisis estratificado por la metodología empleada en la evaluación del estrés ambiental, los resultados de Karg y cols. [70] mostraron una evidencia robusta de la existencia de una interacción entre el polimorfismo 5-HTTLPR y el ambiente en depresión cuando éste se evaluaba mediante entrevistas estructuradas y validadas ( $p\text{-value}=0.0002$ ), y no tan fuerte en el caso de los estudios que exploraban la adversidad ambiental de forma autoinformada ( $p\text{-value}=0.042$ )[70].

Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de desarrollar estudios metodológicamente más minuciosos, con una objetiva evaluación de la adversidad ambiental.

Por último, quizá sea cierto que, tal y como se menciona en los trabajos de Risch y cols. [114] y Munafo y cols. [103], respecto al diseño experimental, a día de hoy, no existen demasiados estudios que aborden la interacción 5-HTTLPR y AVEs en depresión con un diseño longitudinal de seguimiento de una cohorte de individuos comparable al de Caspi y cols., [24, 52, 76, 69, 124, 140, 27, 29, 31, 34, 79, 139, 110, 40, 7, 86, 80, 35, 58, 84, 48] y, de ellos, aún menor es el número de estudios realizados sobre muestras representativas de la población general [24].

En este sentido, nuestro grupo ha desarrollado recientemente un trabajo



**Figura 3.** Representación de los p-values derivados de cada estudio de interacción entre el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT, el estrés ambiental y depresión, e incluido en el metanálisis de Karg y cols., 2009 [70]. Cada p-value se representa mediante un cuadrado, cuyo tamaño depende del tamaño muestral empleado en el trabajo en cuestión, y se sitúa en el eje de ordenadas según su valor. Los menores valores en este eje corresponden a una mayor evidencia de modulación del efecto de riesgo del ambiente por parte del alelo S del polimorfismo 5-HTTLPR.

sobre una muestra representativa de la población general, seguida longitudinalmente, cuyos resultados, aún en preparación, apuntan hacia la existencia de una interacción gen-gen-ambiente en depresión. Así, a la vista de nuestros resultados, el riesgo para depresión durante el periodo de evaluación de 1 año y conferido por la exposición a AVEs, por un lado, o a experiencias de abuso sexual en la infancia, por otro, es modificado por la carga genética individual para los polimorfismos 5-HTTLPR del gen SERT y uMAOA del gen MAOA) [55].

Quizá los estudios con un diseño longitudinal, sean la clave, ya que los estudios longitudinales proporcionan un mayor poder estadístico que los transversales y

posibilitan determinar la dirección de la causalidad, permitiendo relacionar la presencia del factor de riesgo con casos incidentes de la variable resultado que se esté considerando, en nuestro caso, la depresión.

Además, se hace necesario desarrollar estudios metodológicamente más

minuciosos, con una exhaustiva evaluación tanto de la adversidad ambiental como del fenotipo depresivo, de manera objetiva y mediante entrevistas estructuradas y validadas, ya que la heterogeneidad metodológica de los trabajos previos sobre interacción SERT y ambiente en depresión está directamente relacionada con la inconsistencia de hallazgos derivados de tales trabajos [132, 136, ].

## **5.2 Interacción entre otros genes y ambiente en Depresión**

Dada las evidencias existentes a favor de la existencia de una interacción entre el gen SERT y el ambiente en depresión, los investigadores han decidido explorar si otros genes podrían estar ejerciendo el mismo papel modulador del efecto del ambiente sobre el fenotipo final de enfermedad.

Otras proteínas, que han sido implicadas en los mecanismos fisiopatológicos de la depresión, por su papel fundamental en la neurotransmisión serotoninérgica (receptores de serotonina de tipo 1A, 2A o 2C, la enzima tirosina hidroxilasa), la neurotransmisión dopaminérgica (como el transportador de dopamina, DAT1) o proteínas importantes en la funcionalidad del eje HPA (como el receptor tipo 1 de CRH (CRHR1), receptores de glucocorticoides (GRs), genes reguladores como FKBP5 o factores neurotróficos (como BDNF), están sirviendo de fuente de elección de genes en los que testar la posible existencia de relaciones de interacción con factores ambientales de riesgo en depresión.

Sin embargo, los trabajos publicados hasta el momento que exploran la posible existencia de una interacción genético-ambiental en depresión para otros genes distintos al gen SERT no son aún demasiado numerosos.

### *5.2.1 Interacción entre otros genes serotoninérgicos y ambiente en depresión*

Las primeras investigaciones fueron desarrolladas sobre el polimorfismo uMAOA del gen MAOA.

Este gen es clave en depresión, ya que codifica un enzima, denominada monoamino-oxidasa A, que cataliza la degradación de monoaminas.

El gen MAOA, se encuentra en el cromosoma X y presenta, en su zona promotora, un polimorfismo funcional de tipo VNTR, denominado uMAOA, de gran interés, ya que ha sido relacionado con diferencias en la actividad del enzima MAOA [119]. Su posible implicación en la etiología de la depresión viene motivada porque aquellos alelos de este polimorfismo que determinan una alta

actividad enzimática, darían lugar a una mayor tasa de degradación de monoaminas, provocando una reducción de los niveles monoaminérgicos en el espacio intersináptico, lo cual se ha asociado con depresión [144].

A pesar de las evidencias a favor de la existencia de una interacción genético-ambiental entre el polimorfismo uMAOA del gen MAOA y las experiencias de maltrato en la infancia en trastornos psiquiátricos tales como la personalidad antisocial [23, 78, 129], a día de hoy, pocos estudios han explorado, y los que lo han hecho ha sido de forma muy sutil, el posible papel modulador de este gen sobre el efecto de riesgo de la adversidad ambiental en depresión.

Eley y cols., 2004 [45], en un trabajo realizado sobre una muestra de adolescentes, no encontró relación alguna entre el genotipo para el polimorfismo uMAOA, AVEs y depresión. Sin embargo, años más tarde, Cicchetti y cols., 2007 [32], también en una muestra de adolescentes, describió la existencia de una interacción entre los genotipos de baja actividad del enzima MAOA, maltrato y depresión. Además, describe una triple interacción entre el genotipo S/S del gen del transportador de serotonina, el genotipo de baja actividad del enzima MAOA, abuso sexual y depresión.

Algunos trabajos han explorado, aunque de forma muy tímida, la existencia de una posible interacción gen-ambiente en depresión con otros genes clave en la neurotransmisión serotoninérgica, tales como los genes de receptores de serotonina de tipo 2A, 2C y 1A o el gen del enzima tirosina hidroxilasa (TPH).

Aunque la mayoría de trabajos han fallado en encontrar evidencias de la existencia de interacciones genético-ambientales para estos otros genes en depresión [45, 30], se han producido algunos hallazgos positivos, especialmente para los genes HTR1A y TPH2.

Así, Zhang y cols. [145] describieron, en una muestra de jóvenes asiáticos, que el genotipo G/G del polimorfismo rs6295 del gen para el receptor serotoninérgico HTR1A parece tener un efecto modulador de la interacción existente entre el genotipo L/L-5HTTLPR del gen SERT, AVEs y deficiente apoyo social en la aparición de sintomatología depresiva [145]. Además, recientemente se ha apuntado al polimorfismo G-703-T del gen del enzima tiroxina hidroxilasa tipo 2 (TPH2) como modulador del efecto de riesgo para desencadenamiento de problemas afectivos producidos por una desestructuración familiar [106].

Más investigaciones son necesarias para explorar el posible papel



modulador del efecto ambiental por parte de estos y otros genes clave en la neurotransmisión serotoninérgica.

### *5.2.2 Interacción entre genes dopaminérgicos y ambiente en depresión*

La neurotransmisión dopaminérgica está relacionada con los procesos de motivación, atención y placer, los cuales se encuentran alterados en los pacientes deprimidos.

Los trabajos previos de interacción genético-ambiental en genes dopaminérgicos se han centrado más bien en explorar si estos genes modulan el efecto perjudicial del ambiente en el desarrollo de personalidades tendentes a la búsqueda de novedad que en el trastorno depresivo [74].

Solo un trabajo, realizado sobre una muestra de hombres jóvenes, describió un efecto de interacción entre el polimorfismo rs40184 del gen del transportador de dopamina (DAT1) y el rechazo maternal en depresión, de modo que el rechazo maternal incrementaba el riesgo de desarrollar depresión más en el grupo de jóvenes con el genotipo T/T para el polimorfismo rs40184 de este gen que en los que portaban otros genotipos [57].

De nuevo, futuras investigaciones, centradas en explorar la posible interacción entre genes dopaminérgicos y el ambiente son necesarias.

### *5.2.3 Interacción entre genes del eje HPA y ambiente en depresión*

Como ya se ha comentado con anterioridad el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA) es un sistema neuroendocrino involucrado en la coordinación de la respuesta neural, hormonal y comportamental al estrés, cuya disfunción ha sido ampliamente asociada a la etiología de la depresión.

Dada la implicación del eje HHA en la etiología de la depresión, los investigadores interesados en explorar la existencia de interacciones genético-ambientales en el trastorno depresivo están comenzando a desarrollar estudios centrados en los genes que codifican proteínas con un papel regulador de la función de este eje.

Uno de estos genes es el gen del receptor de tipo 1 de la hormona liberadora de corticotropina (gen CRHR1). En 2008, Bradley y cols. describieron un efecto protector para depresión del haplotipo T-A-T (rs7209436-rs110402-rs242924) para individuos expuestos a maltrato en la infancia, de modo que entre los individuos que habían sufrido experiencias de maltrato, aquellos con el haplotipo T-A-T tenían menor riesgo de padecer depresión en comparación con

los que portaban otras combinaciones haplotípicas [12]. Otros trabajos posteriores han replicado estos hallazgos, aunque solo en una muestra de mujeres [109], sugiriendo que tal interacción genético-ambiental podría ser dependiente del sexo, aunque diferencias metodológicas en cuanto a cómo se evaluó la variable ambiental podrían estar detrás de parcialidad en la replicación.

Por otro lado, esta interacción entre el gen CRHR1 y maltrato en depresión parece, además, estar mediada también por el alelo S del polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT [111], evidenciando la conexión existente entre el sistema serotoninérgico y el eje HHA [46]. Por último, otras investigaciones han descrito la existencia de una interacción entre los polimorfismos rs110902 y rs242924 del gen CRHR1 y maltrato en la infancia en la respuesta al estrés (evaluada mediante medición de los niveles plasmáticos de cortisol) [131, 63].

La modulación de la respuesta al estrés está mediada por un circuito de feed-back en el que juegan un importante papel los receptores de glucocorticoides (GRs). La desregulación en el eje HHA ampliamente descrita en individuos deprimidos parece estar mediada por una sensibilidad alterada de estos receptores, por lo que los genes que codifican estas proteínas receptoras de glucocorticoides han surgido como posibles candidatos para testar relaciones de interacción gen-ambiente en depresión.

Así, Bet et al., 2009 describieron recientemente un efecto modulador por parte de los polimorfismos 22/23EK y 9beta del gen NR3C1 (gen del receptor de glucocorticoide de la subfamilia 3, grupo C, miembro 1) del riesgo para padecer depresión conferido por la adversidad ambiental en la infancia [18], aunque lo cierto es que éste constituye el único trabajo publicado, a día de hoy, que explora una posible interacción de estos genes con la adversidad ambiental en depresión.

#### *5.2.4 Interacción entre genes neurotróficos y ambiente en depresión*

Quizá uno de los genes que empiezan a ser más activamente explorados desde los estudios de interacción genético-ambiental en depresión es el gen BDNF, que codifica una proteína (factor neurotrófico derivado del cerebro) con un importante papel en la plasticidad neuronal.

Este gen ha sido relacionado con la patofisiología de la depresión y con la respuesta al estrés, ya que ambos conllevan una atrofia neuronal en la amígdala, la corteza prefrontal y el hipocampo que parece estar mediada por descensos en

esta proteína BDNF [43].

El gen BDNF contiene un polimorfismo (Val66Met) de tipo funcional que provoca un cambio aminoacídico de Valina a Metionina en la posición 66 de la proteína, y que parece tener consecuencias en su actividad neurotrófica [44].

Algunos investigadores han descrito un efecto modulador del riesgo para depresión conferido por las experiencias de maltrato en la infancia provocado por el genotipo para el polimorfismo Val66Met. Así, Kauffman y cols. [72], en 2006, encontraron, en una muestra de niños, que el genotipo para el polimorfismo Val66Met del gen BDNF modulaba la interacción entre existente entre el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SERT y las experiencias de maltrato en depresión. Entre los niños que habían sufrido experiencias de maltrato, aquellos con los genotipos SS y Met/\* eran los que tenían mayores riesgos para padecer depresión. En este trabajo además se describió una cuádruple interacción entre el genotipo SERT-S/S, BDNF-Met/\*, historia de maltrato, soporte social y riesgo para depresión.

Estudios posteriores han replicado los hallazgos de interacción del gen BDNF con maltrato y depresión en una muestra de mujeres gemelas adultas con historia previa de maltrato en la infancia [139, 1].

Por último, otros trabajos asocian las experiencias de acontecimientos vitales estresantes (AVEs) con el genotipo para los polimorfismos 5HTTLPR del gen SERT y Val66Met el gen BDNF y riesgo para depresión en una muestra de ancianos [79].

Así, pues, se hace necesario el desarrollo de nuevos estudios de interacción genético-ambiental en depresión para clarificar el posible papel que este y otros genes pudieran tener en el origen de la enfermedad.

### **5.3 Interacción genético ambiental en Depresión. Evidencias desde otros campos de investigación.**

Existen estudios realizados desde otros campos de investigación que han explorado la existencia de una relación de interacción genético-ambiental en depresión.

Una aproximación puramente estadística, mediante metanálisis que pretenden testar si se ha replicado o no un único estudio observacional realizado sobre humanos, el de Caspi y cols., [24] quizá no sea del todo suficiente para aunar las evidencias a favor o en contra de la existencia de una interacción gen-ambiente en depresión.

Así, una perspectiva más integradora, que incluyera trabajos publicados desde diferentes campos de investigación (a nivel celular, sobre roedores o primates), con diferentes metodologías (neuroimagen, neurociencia experimental) y diseños experimentales, sería más adecuada para validar la existencia de una interacción gen-ambiente en depresión.

En este sentido, el estudio de Hariri y cols de 2002 [61], ya mencionado anteriormente, en el que, frente a estímulos de miedo, se describía una actividad amigdalар modulada por el genotipo para el gen SERT, no es el único trabajo de neuroimagen funcional a favor de la existencia de una relación entre el genotipo para el polimorfismo 5-HTTLPR y mecanismos asociados a estrés. Estos hallazgos se han replicado en muestras independientes, tanto en individuos sanos como en pacientes psiquiátricos [70, 64, 17, 22, 60, 20, 36, 41, 65, 37, 125]. Recientemente, se ha descrito, además, una más rápida activación amigdalар frente a estímulos de miedo en los individuos con el genotipo SS [49].

Por otro lado, desde los estudios realizados sobre primates, se ha asociado el alelo S a mayores niveles de desesperanza [127] y mayor activación del eje HPA [11] en animales sometidos a separación social. Al separar a las crías de primates de sus madres y criarlas con otras crías, lo cual constituye un modelo de estrés temprano en animales, se constató la existencia de una modulación por parte del polimorfismo 5-HTTLPR del efecto adverso de la separación, de modo que los animales con el alelo S demostraban mayor ansiedad, agitación y una respuesta exagerada del eje HPA en comparación con los primates con genotipo L/L, y este efecto perduraba durante toda la vida, tal y como ocurre en humanos [127, 11].

Por último, los estudios desarrollados sobre ratones y ratas knock-out para el gen 5HTT, muestran comportamientos más ansiosos, mecanismos de extinción del miedo disminuidos y respuestas exageradas al estrés en comparación con los animales de genotipo salvaje [67].

Así pues, desde esta aproximación integradora, los hallazgos aportados desde las investigaciones realizadas hasta el momento, con diferentes diseños experimentales en distintas especies, parecen ir más en la línea de la existencia de una interacción genético-ambiental en depresión, aunque más investigaciones son necesarias.

## **6 Conclusión**

El hecho observable de que existen unos individuos más susceptibles que otros al efecto ambiental, ha sido la razón por la que los investigadores han explorado las posibles relaciones de interacción entre la carga genética individual y el ambiente en multitud de trastornos de etiología compleja, aunque con resultados no del todo concluyentes.

En el caso de la depresión, más investigaciones son necesarias para explorar el posible papel modulador por parte de los genes del efecto ambiental de riesgo para la enfermedad, mediante estudios metodológicamente más minuciosos, de diseño longitudinal, con una objetiva evaluación tanto de la adversidad ambiental como del fenotipo depresivo, de manera objetiva y mediante entrevistas estructuradas y validadas. Además, es importante tomar en consideración las evidencias existentes desde otros campos de investigación que han explorado la existencia de una relación de interacción genético-ambiental en depresión (a nivel celular, sobre roedores o primates), con diferentes metodologías (neuroimagen, neurociencia experimental) y diseños experimentales.

Así, con una visión integradora, los hallazgos aportados desde las investigaciones realizadas hasta el momento, con diferentes diseños experimentales en distintas especies, parecen ir más en la línea de la existencia de una interacción genético-ambiental en depresión, aunque más investigaciones son necesarias.

## **Referencias**

1. Aguilera M, Arias B, Wichers M, Barrantes-Vidal N, Moya, H. Villa, Van Os J, Ibáñez M.I, Ruiperez G, Ortet y Fañanas L. Early adversity and 5-HTT/BDNF genes: new evidence of gene–environment interactions on depressive symptoms in a general population. *Psychological Medicine* 2009, 39: 1425–1432.
2. Alexander N, Kuepper Y, Schmitz A, Osinsky R, Kozyra E, Hennig J. Gene–environment interactions predict cortisol responses after acute stress: Implications for the etiology of depression. *Psychoneuroendocrinology* 2009, 34: 1294–1303
3. American Psychiatric Association DSM-IV-TR (Manual Diagnostico y Estadistico para Enfermedad Mental) 2000. 4 ed
4. Anderson KM, Wilson PWF, Odell PM, Kannel WB An Updated Coronary Risk Profile - A Statement for Health-Professionals. *Circulation* 1991, 83: 356-362.
5. Angst J The course of affective disorders. *Psychopathology* 1986 19: Suppl 2: 47-52)
6. Arango V, Ernsberger P, Marzuk PM, Chen JS, Tierney H, Stanley M, Reis DJ, Mann JJ. Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT<sub>2</sub> and beta-adrenergic receptor binding sites in the brain of suicide victims. *Arch. Gen. Psychiatry* 1999, 47: 1038-1047
7. Araya R, Hu X, Heron J, Enoch M-A, Evans J, Lewis G, Nutt D, Goldman D. Effects of Stressful Life Events, Maternal Depression and 5-HTTLPR Genotype on Emotional Symptoms in Pre-Adolescent Children. *Am J Med Genet Part B* 2009, 150B:670–682.
8. Arora RC, Meltzer HY Increased serotonin 2(5HT-2) receptor binding as measured by 3H-lysergic acid diethylamide (3H-LSD) in the blood platelets of depressed patients. *Life Sci* 1989; 44: 725-734.
9. Aslund C, Leppert J, Comasco E, Nordquist N, Oreland L, Nilsson KW. Impact of the Interaction Between the 5HTTLPR Polymorphism and Maltreatment on Adolescent Depression. A Population-Based Study. *Behav Genet* 2009, 39:524–531.
10. Axelrod J, Weil-Malherbe H, Tomchick R. The physiological disposition of H<sub>3</sub>-epinephrine and its metabolite metanephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1959, 127: 251-256.
11. Barr C, Newman T, Shannon C, et al. Rearing condition and rh5-HTTLPR interact to influence limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in infant macaques. *Biol Psychiatry* 2004, 55:733–738.
12. Bradley RG, Binder EB, Epstein MP, Tang Y, Nair HP, Liu W, et al. Influence of child abuse on adult depression: Moderation by the corticotropin-

- releasing hormone receptor gene. *Arch Gen Psychiatry* 2008, 65:190–200.
13. Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358: 55-68
  14. J Belsky, C Jonassaint, M Pluess, M Stanton, B Brummett and R Williams. Vulnerability genes or plasticity genes?. *Molecular Psychiatry* 2009, 14: 746–754.
  15. Benjet C, Thompson RJ and Gotlib IH. 5-HTTLPR moderates the effect of relational peer victimization on Depressive symptoms in adolescent girls. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 2010, 51:2, pp 173–179.
  16. Bennett AJ, Lesch KP, Heils A, Long JC, Lorenz JG, Shoaf SE, Champoux M, Suomi SJ, Linnoila MV, Higley JD. Early experience and serotonin transporter gene variation interact to influence primate CNS function. *Mol. Psychiatry* 2002, 7: 118-122.
  17. Bertolino A, Arciero G, Rubino V, Latorre V, De Candia M, Maz-zola V, Blasi G, Caforio G, Hariri A, Kolachana B, Nardini M, Weinberger DR, Scarabino T: Variation of human amygdala response during threatening stimuli as a function of 5-HTTLPR genotype and personality style. *Biol Psychiatry* 2005, 57:1517–1525.
  18. Bet PM, Penninx BWJH, Bochdanovits Z, Uitterlinden AG, Beekman ATF, NMv S, Deeg DJH, Hoogendijk WJG. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and childhood adversity are associated with depression: new evidence for a gene-environment interaction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009, 150B:660–669.
  19. Boyce P, Parker G, Barnett B, Cooney M, Smith F. Personality as a vulnerability factor to depression. *Br. J. Psychiatry* 1991, 159: 106-114.
  20. Brown SM, Hariri AR. Neuroimaging studies of serotonin gene polymorphisms: exploring the interplay of genes, brain, and behavior. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2006, 6:44–52.
  21. Brummett BH, Krystal AD, Siegler IC, Kuhn C, Surwit RS, Zuchner S, Shley-Koch A, Barefoot JC, Williams RB. Associations of a regulatory polymorphism of monoamine oxidase-A gene promoter (MAOA-uVNTR) with symptoms of depression and sleep quality. *Psychosom. Med.* 2007, 69: 396-401.
  22. Canli T, Omura K, Haas BW, Fallgatter A, Constable RT, Lesch KP. Beyond affect: a role for genetic variation of the serotonin transporter in neural activation during a cognitive attention task. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:12224–12229.
  23. Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, Taylor A, Poulton R. Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science* 2002, 297: 851-854.
  24. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J,

- Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003, 301: 386-389.
25. Caspi A, Hariri H.R, Holmes A, Uher R, Moffitt T.E. Genetic Sensitivity to the Environment: The Case of the Serotonin Transporter Gene and Its Implications for Studying Complex Diseases and Traits. *Am J Psychiatry* 2010, 167:509–52.
26. Catalán R. Epidemiología y factores de riesgo de los trastornos afectivos. En: *Tratado de Psiquiatría 2004*, 1083-1094. Barcelona: Psiquiatría Editores, S.L.
27. Cervilla JA, Molina E, Rivera M, Torres-Gonzalez F, Bellon JA, Moreno B, Luna JD, Lorente JA, Mayoral F, King M, Nazareth I, Gutierrez B. The risk for depression conferred by stressful life events is modified by variation at the serotonin transporter 5HTTLPR genotype: evidence from the Spanish PREDICT-Gene cohort. *Mol. Psychiatry* 2007, 12: 748-755.
28. Cervilla JA, Rivera M, Molina E, Torres-Gonzalez F, Bellon JA, Moreno B, de Dios LJ, Lorente JA, de Diego-Otero Y, King M, Nazareth I, Gutierrez B. The 5-HTTLPR s/s genotype at the serotonin transporter gene (SLC6A4) increases the risk for depression in a large cohort of primary care attendees: the PREDICT-gene study. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2006, 141B: 912-917.
29. Chipman P, Jorm AF, Prior M, Sanson A, Smart D, Tan X, Easteal S. No interaction between the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) and childhood adversity or recent stressful life events on symptoms of depression: results from two community surveys. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2007, 144B: 561-565.
30. Chipman P, Jorm AF, Tan X, Easteal S. No association between the serotonin-1A receptor gene single nucleotide polymorphism rs6295C/G and symptoms of anxiety or depression, and no interaction between the polymorphism and environmental stressors of childhood anxiety or recent stressful life events on anxiety or depression. *Psychiatr Genet* 2010, 20: (1):8–13.
31. Chorbov V, Lobos E, Todorov A, Heath AC, Botteron K, Todd R. Relationship of 5-HTTLPR genotypes and depression risk in the presence of trauma in a female twin sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007, 144B:830–833.
32. Cicchetti D, Rogosch FA, Sturge-Apple ML. Interactions of child maltreatment and serotonin transporter and monoamine oxidase A polymorphisms: depressive symptomatology among adolescents from low socioeconomic status backgrounds. *Dev Psychopathol.* 2007;19(4):1161-1180.
33. Collier DA, Stober G, Li T, Heils A, Catalano M, Di BD, Arranz MJ, Murray



- RM, Vallada HP, Bengel D, Muller CR, Roberts GW, Smeraldi E, Kirov G, Sham P, Lesch KP. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol. Psychiatry* 1996, 1: 453-460.
34. Covault J, Tennen H, Armeli S, Conner TS, Herman AI, Cillessen AH, Kranzler HR. Interactive effects of the serotonin transporter 5-HTTLPR polymorphism and stressful life events on college student drinking and drug use. *Biol. Psychiatry* 2007, 61: 609-616.
35. Coventry WL, James MR, Eaves LJ, Gordon SD, Gillespie NA, Ryan L, Heath AC, Montgomery GW, Martin NG, Wray NR. Do 5HTTLPR and stress interact in risk for depression and suicidality? item response analyses of a large sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010;153B(3):757-765.
36. Dannlowski U, Ohrmann P, Bauer J, Deckert J, Hohoff C, Kugel H, Arolt V, Heindel W, Kersting A, Baune BT, Suslow T. 5-HTTLPR biases amygdala activity in response to masked facial expressions in major depression. *Neuropsychopharmacology* 2007; 33:418-424.
37. Dannlowski U, Ohrmann P, Bauer J, Kugel H, Baune BT, Hohoff C, Kersting A, Arolt V, Heindel W, Deckert J, Suslow T. Serotonergic genes modulate amygdala activity in major depression. *Genes Brain Behav* 2007; 6:672-676.
38. De Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Rev Neuroscience* 2005, 6:463-475
39. Dinan TG. Psychoneuroendocrinology of mood disorders. *Current Opinion in Psychiatry* 2001, 14 (1):51-55.
40. Doornbos B, Dijck-Brouwer DAJ, Kema IP, Tanke MAC, van Goor SA, Muskiet FAJ, Korf J. The development of peripartum depressive symptoms is associated with gene polymorphisms of MAOA, 5-HTT and COMT. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2009, 33: 1250-1254
41. Domschke K, Braun M, Ohrmann P, Suslow T, Kugel H, Bauer J, Hohoff C, Kersting A, Engelien A, Arolt V, Heindel W, Deckert J. Association of the functional -1019C/G 5-HT1A polymorphism with prefrontal cortex and amygdala activation measured with 3 T fMRI in panic disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2006; 9:349-355.
42. Dressler William W, Balieiro Mauro C, Ribeiro Rosane P, Dos Santos Jose´ Ernesto. Cultural consonance, a 5ht2A receptor polymorphism, and depressive Symptoms: a longitudinal study of gene 3 culture interaction in urban Brazil. *American Journal of Human Biology* 2009, 21:91-97.
43. Duman RS, Monteggia LM A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 2006, 59:1116-1127.

44. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003, 112:257–269.
45. Eley TC, Sugden K, Corsico A, Gregory AM, Sham P, McGuffin P, Plomin R, Craig IW. Gene-environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression. *Mol. Psychiatry* 2004, 9: 908-915.
46. El Hage W, Powell JF, Surguladze SA Vulnerability to depression: what is the role of stress genes in gene×environment interaction? *Psycho. Med* 2009, 39:1407–1411.
47. Evans J, Xu K, Heron J, Enoch M-A, Araya R, Lewis G, Timpson N, Davies S, Nutt D, Goldman D. Emotional Symptoms in Children: The Effect of Maternal Depression, Life Events, and COMT Genotype. *Am J Med Genet Part B* 2009, 150B:209–218.
48. Fergusson D.M, Horwood L.J, Miller A.L and Kennedy M.A. Life stress, 5-HTTLPR and mental disorder: findings from a 30-year longitudinal study. *The British Journal of Psychiatry* 2011 198: 129-135.
49. Furman D, Hamilton J, Joormann J, Gotlib I. Altered timing of amígdala activation during sad mood elaboration as a function of 5-HTTLPR. *Soc Cogn Affect Neurosci* 6(3) 2011:270-6.
50. Furmark T, Tillfors M, Garpenstrand H, Marteinsdottir I, Långström B, Orelund L, Fredrikson M. Serotonin transporter polymorphism related to amygdala excitability and symptom severity in patients with social phobia. *Neuroscience Letters* 2004, 362:189–192.
51. Gibb BE, Butler AC, Beck JS. Childhood abuse, depression, and anxiety in adult psychiatric outpatients. *Depress. Anxiety* 2003, 17: 226-228.
52. Gillespie NA, Whitfield JB, Williams B, Heath AC, Martin NG. The relationship between stressful life events, the serotonin transporter (5-HTTLPR) genotype and major depression. *Psychol. Med.* 2005, 35: 101-111.
53. Goldman NoreenDana D, A. Gleib, Lin Yu-Hsuan and Weinstein Maxine. The serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR): allelic variation and links with depressive symptoms. *Depression And Anxiety* 2010, 27: 260–269.
54. Grabe HJ, Lange M, Wolff B, Volzke H, Lucht M, Freyberger HJ, John U, Cascorbi I. Mental and physical distress is modulated by a polymorphism in the 5-HT transporter gene interacting with social stressors and chronic disease burden. *Mol. Psychiatry* 2005, 10: 220-224.
55. Gutiérrez B, Cervilla J.A., Rivera M, Molina E, Luna J.D, Torres F, Bellón-Saameño J.A., Moreno B, King M, Nazareth I. Gene by Gene by Environment Interactions as Determinants of Major Depression: A Prospective Analysis of the PREDICT-Gene Cohort. En preparación.
56. Gutierrez B, Pintor L, Gasto C, Rosa A, Bertranpetit J, Vieta E, Fananas L.

- Variability in the serotonin transporter gene and increased risk for major depression with melancholia. *Hum. Genet.* 1998, 103: 319-322.
57. Haeffel G.J, Getchell M, Kuposov R.A, Yrigollen C.M, DeYoung C.G, af Klinteberg B, Orelan L, Ruchkin V.V and Grigorenko E.L. Association between polymorphisms in the dopamine transporter gene and depression. Evidence for a gene-environment interaction in a sample of juvenile detainees. *Psychol Sci* 2008, 19:62–69.
  58. Hammen C, Brennan P.A, Keenan-Miller D, Hazel N A and Najman J.M. Chronic and acute stress, gender, and serotonin transporter gene–environment interactions predicting depression symptoms in youth. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 2010, 51:2: 180–187.
  59. Hamer D. Genetics. Rethinking behavior genetics. *Science* 2002, 298: 71-72.
  60. Hariri AR, Drabant EM, Munoz KE, Kolachana BS, Mattay VS, Egan MF, Weinberger DR. A susceptibility gene for affective disorders and the response of the human amygdala. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62:146–152.
  61. Hariri AR, Tessitore A, Mattay VS, Fera F, Weinberger DR. The amygdala response to emotional stimuli: a comparison of faces and scenes. *Neuroimage* 2002, 17: 317-323.
  62. Hedges LV, Olkin I. *Statistical Methods for Meta-Analysis*. New York Academic 1985.
  63. Heim C, Bradley B, Mletzko TC, Deveau TC, Musselman DL, Nemeroff CB, Ressler KJ, Binder EB. Effect of childhood trauma on adult depression and neuroendocrine function: sexspecific moderation by CRH receptor 1 gene. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2009, 3:1–10.
  64. Heinz A, Braus DF, Smolka MN, Wrase J, Puls I, Hermann D, Klein S, Grusser SM, Flor H, Schumann G, Mann K, Buchel C. Amygdala-prefrontal coupling depends on a genetic variation of the serotonin transporter. *Nat Neurosci* 2005, 8:20–21.
  65. Heinz A, Smolka MN, Braus DF, Wrase J, Beck A, Flor H, Mann K, Schumann G, Büchel C, Hariri AR, Weinberger DR. Serotonin transporter genotype (5-HTTLPR): effects of neutral and undefined conditions on amygdala activation. *Biol Psychiatry* 2007, 61:1011–1014.
  66. Hirschfeld RM, Klerman GL, Lavori P, Keller MB, Griffith P, Coryell W. Premorbid personality assessments of first onset of major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 1989, 46: 345-350.
  67. Homberg J, Olivier J, Smits B, Mul J, Mudde J, Verheul M, Nieuwenhuizen O, Cools A, Ronken E, Cremers T, Schoffelmeer A, El-Ienbroek B, Cuppen E: Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neuroscience* 2007, 146:1662–1672.
  68. Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression.

- Neuropsychopharmacology 2000, 23: 477-501.
69. Jacobs N, Kenis G, Peeters F, Derom C, Vlietinck R, Van OJ. Stress-related negative affectivity and genetically altered serotonin transporter function: evidence of synergism in shaping risk of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 2006, 63: 989-996.
  70. Karg K, Burmeiste M, Shedden K, Se S. The Serotonin Transporter Promoter Variant (5-HTTLPR), Stress, and Depression Meta-analysis Revisited Evidence of Genetic Moderation. *Arch Gen Psychiatry* 2011, 68(5):444-454.
  71. Kaufman J, Gelernter J, Kaffman A, et al. Arguable assumptions, debatable conclusions. *Br J Psychiatry* 2010, 65:211–219.
  72. Kaufman J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Grasso D, Lipschitz D, Houshyar S, Krystal JH, Gelernter J. Brain-derived neurotrophic factor-5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children. *Biol. Psychiatry* 2006, 59: 673-680.
  73. Kaufman J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Houshyar S, Lipschitz D, Krystal JH, Gelernter J. Social supports and serotonin transporter gene moderate depression in maltreated children. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 2004, 101: 17316-17321.
  74. Keltikangas-Jarvinen L & Salo J. Dopamine and serotonin systems modify environmental effects on human behavior: A review. *Scandinavian Journal of Psychology* 2009, 50: 574-582.
  75. Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, MacLean C, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am. J. Psychiatry* 1995, 152: 833-842.
  76. Kendler KS, Kuhn JW, Vittum J, Prescott CA, Riley B. The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. *Arch. Gen. Psychiatry* 2005, 62: 529-535.
  77. Kessler RC, Berglund P, Denler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 2003, 289:3095-105.
  78. Kim-Cohen J, Caspi A, Taylor A, Williams B, Newcombe R, Craig IW, Moffitt TE. MAOA, maltreatment, and gene-environment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis. *Mol. Psychiatry* 2006, 11: 903-913.
  79. Kim JM, Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Kim YH, Yoon JS. Interactions between life stressors and susceptibility genes (5-HTTLPR and BDNF) on depression in Korean elders. *Biol. Psychiatry* 2007, 62: 423-428.
  80. Kim JM, Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Yoon JS. Modification by two genes of associations between general somatic health and incident

- depressive syndrome in older people. *Psychosomatic Medicine* 2009, 71:286–291.
81. King M, Nazareth I, Levy G, Walker C, Morris R, Weich S, Bellon-Saameno JA, Moreno B, Svab I, Rotar D, Rifel J, Maarros HI, Aluoja A, Kalda R, Neeleman J, Geerlings MI, Xavier M, de Almeida MC, Correa B, Torres-Gonzalez F. Prevalence of common mental disorders in general practice attendees across Europe. *British Journal of Psychiatry* 2008, 192: 362-367.
82. King M, Walker C, Levy G, Bottomley C, Royston P, Weich S, Bellon-Saameno JA, Moreno B, Svab I, Rotar D, Rifel J, Maarros HI, Aluoja A, Kalda R, Neeleman J, Geerlings MI, Xavier M, Carraca I, Goncalves-Pereira M, Vicente B, Saldivia S, Melipillan R, Torres-Gonzalez F, Nazareth I. Development and validation of an international risk prediction algorithm for episodes of major depression in general practice attendees: the PredictD study. *Arch. Gen. Psychiatry* 2008, 65: 1368-1376.
83. Koenen K, Galea S. Gene-environment interactions and depression. *JAMA* 2009, 302:1859.
84. Kumsta R, Stevens S, Brookes K, Schlotz W, Castle J, Beckett C, Kreppner J, Rutter and Sonuga-Barke E. 5HTT genotype moderates the influence of early institutional deprivation on emotional problems in adolescence: evidence from the English and Romanian Adoptee (ERA) study. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 2010, 51:7: 755–762.
85. Langer SZ. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol. Rev.* 1980, 32: 337-362.
86. Laucht M, Treutlein J, Blomeyer D, Buchmann AF, Schmid B, Becker K, Zimmermann US, Schmidt MH, Esser G, Rietschel M and Banaschewski T. Interaction between the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism and environmental adversity for mood and anxiety psychopathology: evidence from a high-risk community sample of young adults. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2009, 12: 737–747.
87. Lasky-Su JA, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT. Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2005, 133B: 110-115.
88. Lazary J, Lazary A, Gonda X, Benko A, Molnar E, Juhasz G, Bagdy G. New evidence for the association of the serotonin transporter gene (SLC6A4) haplotypes, threatening life events, and depressive phenotype. *Biol. Psychiatry* 2008, 64: 498-504.
89. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy D. L. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region.

- Science 1996, 274: 1527-1531.
90. Levinson DF. The genetics of depression: a review. *Biol Psychiatry* 2006, 60: 84–92.
  91. Lotrich F, Lenze E. Gene-environment interactions and depression. *JAMA* 2009; 302:1859–1860.
  92. Lotrich FE and Pollock BG. Meta-analysis of serotonin transporter polymorphisms and affective disorders. *Psychiatric Genetics* 2004, 14 (3):121-129.
  93. Maes M MH. The serotonin hypothesis of major depression. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven Press, 1995.
  94. Mandell AJ, Setz KA Applications of statistical dynamics in developmental psychobiology. *Dev. Psychobiol.* 1995, 28: 415-418.
  95. Mandelli L, Serretti A, Marino E, Pirovano A, Calati R, Colombo C. Interaction between serotonin transporter gene, catechol-O-methyltransferase gene and stressful life events in mood disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2007, 10: 437-447.
  96. Mandelli L, Marino E, Pirovano A, Calati R, Zanardi R, Colombo C, Serretti A. Interaction between SERTPR and stressful life events on response to antidepressant treatment. *European Neuropsychopharmacology* 2009, 19: 64–67.
  97. McGuffin P, Katz R, Watkins S, Rutherford J. A hospital-based twin register of the heritability of DSM-IV unipolar depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 1996, 53: 129-136.
  98. McQuaid JR, Monroe SM, Roberts JE, Kupfer DJ, Frank E. A comparison of two life stress assessment approaches: prospective prediction of treatment outcome in recurrent depression. *J Abnorm Psychol* 2000, 109: 787–791.
  99. Middeldorp CM, de Geus EJ, Beem AL, et al. Family based association analyses between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and neuroticism, anxiety and depression. *Behav Genet.* 2007. 37(2):294-301.
  100. Moffitt TE, Caspi A, Rutter M. Strategy for investigating interactions between measured genes and measured environments. *Arch. Gen. Psychiatry* 2005, 62: 473-481.
  101. Monroe SM. Modern approaches to conceptualizing and measuring human life stress. *Annu Rev Clin Psychol* 2008, 4: 33–52.
  102. Mossner R, Daniel S, Albert D, Heils A, Okladnova O, Schmitt A, Lesch KP. Serotonin transporter function is modulated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not nerve growth factor (NGF). *Neurochem. Int.* 2000, 36: 197-202.
  103. Munafò M.R, Durrant C, Lewis G and Flint J. Gene\_Environment

- Interactions at the Serotonin Transporter Locus. *Biological Psychiatry* 2009, 65: 211-219.
104. Murphy DL, Li Q, Engel S, Wichems C, Andrews A, Lesch KP, Uhl G. Genetic perspectives on the serotonin transporter. *Brain Res. Bull.* 2011, 56: 487-494.
  105. Nakatani D, Sato H, Sakata Y, Shiotani I, Kinjo K, Mizuno H, Shimizu M, Ito H, Koretsune Y, Hirayama A, Hori M. Influence of serotonin transporter gene polymorphism on depressive symptoms and new cardiac events after acute myocardial infarction. *American Heart Journal* 2005, 150: 652-658.
  106. Nobile M, Rusconi M, Bellina M, Marino C, Giorda R, Carlet O, Vanzin L, Molteni M and Battaglia M. The influence of family structure, the TPH2 G-703T and the 5-HTTLPR serotonergic genes upon affective problems in children aged 10–14 years. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 2009 50:3 pp 317–325.
  107. Nugent N.R, Tyrka A.R, Carpenter L.L and Price L.H. Gene–environment interactions: early life stress and risk for depressive and anxiety disorders. *Psychopharmacology* 2011. 214:175–196.
  108. Paykel ES, Cooper Z, Ramana R, Hayhurst H. Life events, social support and marital relationships in the outcome of severe depression. *Psychol. Med.* 1996, 26: 121-133.
  109. Polanczyk G, Caspi A, Williams B, Price TS, Danese A, Sugden K, Uher R, Poulton R, Moffitt TE. Protective effect of CRHR1 gene variants on the development of adult depression following childhood maltreatment: replication and extension. *Arch Gen Psychiatry* 2009, 66:978–985.
  110. Power T, Stewart R, Ancelin ML, Jaussent I, Malafosse A, Ritchie K. 5-HTTLPR genotype, stressful life events and late-life depression: no evidence of interaction in a French population. *Neurobiol Aging.* 2010, 31(5):886-887. [published online ahead of print, 2008].
  111. Ressler KJ, Bradley B, Mercer KB, Deveau TC, Smith AK, Gillespie CF, Nemeroff CB, Cubells JF, Binder EB. Polymorphisms in CRHR1 and the serotonin transporter loci: gene×gene× environment interactions on depressive symptoms. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010, 153b:812–824.
  112. Rieckmann N, Rapp M, Müller-Nordhorn J. Gene-environment interactions and depression. *JAMA* 2009, 302:1861.
  113. Ries K, Risch N. Gene-environment interactions and depression. *JAMA* 2009, 302:1861–1862.
  114. Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang K.Y, Eaves L, Hoh J, Griem A, Kovacs M, Ott J, Merikangas K.R. Interaction Between the Serotonin Transporter Gene (5-HTTLPR), Stressful Life Events, and Risk of Depression. A Meta-

- analysis. *JAMA* 2009, 301(23):2462-2471.
115. Ritchie K, Jaussent I, Stewart R, Dupuy A, Courtet P, Acelin M, Malafosse A. Association of adverse childhood environment and 5-HTTLPR genotype with late-life depression. *J Clin Psychiatry* 2009, 70:1281–1288.
  116. Robins LN, Wing J, Wittchen HU, Helzer JE, Babor TF, Burke J, Farmer A, Jablenski A, Pickens R, Regier DA. The Composite International Diagnostic Interview. An epidemiologic instrument suitable for use in conjunction with different diagnostic systems and in different cultures. *Arch. Gen. Psychiatry* 1988, 45: 1069-1077.
  117. Rutter M. Gene- environment interplay. *Depress Anxiety* 2010, 27:1–4.
  118. Rutter M, Thapar A, Pickles A. Gene-environment interactions biologically valid pathway or artifact? *Arch Gen Psychiatry* 2009, 12:1287–1289.
  119. Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Human Genetics* 1998, 103: 273-279.
  120. Scheid JM, Holzman CB, Jones N, Friderici KH, Nummy KA, Symonds LL, Sikorskii A, Regier MK, Fisher R. Depressive symptoms in mid-pregnancy, lifetime stressors and the 5-HTTLPR genotype. *Genes Brain Behav.* 2007, 6(5): 453-464.
  121. Schildkraut JJ, Orsulak PJ, Schatzberg AF, Gudeman JE, Cole JO, Rohde WA, LaBrie RA. Toward a biochemical classification of depressive disorders. I. Differences in urinary excretion of MHPG and other catecholamine metabolites in clinically defined subtypes of depressions. *Arch. Gen. Psychiatry* 1978, 35: 1427-1433.
  122. Schwan C, Grabe H. Gene-environment interactions and depression. *JAMA* 2009, 302:1860–1861.
  123. Serretti A, Lattuada E, Catalano M, Smeraldi E. Serotonin transporter gene not associated with psychotic symptomatology of mood disorders. *Psychiatry Res.* 1999, 86: 59-65.
  124. Sjöberg RL, Nilsson KW, Nordquist N, Ohrvik J, Leppert J, Lindstrom L, Orelund L. Development of depression: sex and the interaction between environment and a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2006, 9: 443-449.
  125. Smolka MN, Buhler M, Schumann G, Klein S, Hu XZ, Moayer M, Zimmer A, Wrase J, Flor H, Mann K, Braus DF, Goldman D, Heinz A. Gene-gene effects on central processing of aversive stimuli. *Mol Psychiatry* 2007, 12:307–317.
  126. Sobocki P, Jönsson B, Angst J, Rehnberg C. Cost of depression in Europe. *J Ment Health Policy Econ* 2006, 9:87-98.
  127. Spinelli S, Schwandt M, Lindell S, et al. Association between the recombinant human serotonin transporter linked promoter region polymorphism and behavior in rhesus macaques during a separation



- paradigm. *Dev Psychopathol* 2007, 19:977–987.
128. Surtees PG, Wainwright NW, Willis-Owen SA, Luben R, Day NE, Flint. Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder. *Biol. Psychiatry* 2006, 59: 224-229.
  129. Taylor A, Kim-Cohen J. Meta-analysis of gene-environment interactions in developmental psychopathology. *Dev. Psychopathol.* 2007, 19: 1029-1037.
  130. Taylor SE, Way BM, Welch WT, Hilmert CJ, Lehman BJ, Eisenberger NI. Early family environment, current adversity, the serotonin transporter promoter polymorphism, and depressive symptomatology. *Biol Psychiatry* 2006, 60:671–676.
  131. Tyrka AR, Price LH, Gelernter J, Schepker C, Anderson GM, Carpenter LL. Interaction of childhood maltreatment with the corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity. *Biol Psychiatry* 2009, 66:681–685.
  132. Uher R, McGuffin P. The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the etiology of depression: 2009 update. *Mol Psychiatry* 2010, 15:18–22.
  133. Uher R, McGuffin P. The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the aetiology of mental illness: review and methodological analysis. *Mol. Psychiatry* 2008, 13: 131-146.
  134. Van Os J and Rutten B.P.F Gene-environment-wide interaction studies in Psychiatry. *The American Journal of Psychiatry* 2009, 166:9: 964-966.
  135. Widom CS, DuMont K, Czaja SJ. A prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up. *Arch. Gen. Psychiatry* 2007, 64: 49-56.
  136. Wankerl M, Wüst Stefan, Otte Christian. Current development and controversies: does the serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) modulate the association between stress and depression? *Current Opinion in Psychaitry* 2010, 23: 582-587.
  137. Wals M, Verhulst F. Child and adolescent antecedents of adult mood disorders. *Curr. Opin. Psychiatry* 2005, 18: 15-19.
  138. Wermter A.K, Laucht M, Schimmelmann B.G, Banaschewski T, Sonuga-Barke E.J.S, Rietschel M, Becker K. From nature versus nurture, via nature and nurture, to gene-environment interaction in mental disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2010, 19:199–210.
  139. Wichers M, Kenis G, Jacobs N, Mengelers R, Derom C, Vlietinck R, van Os J. The BDNF Va66Met×5-HTTLPR×child adversity interaction and depressive symptoms: an attempt at replication. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008, 47B:120–123.
  140. Wilhelm K, Mitchell PB, Niven H, Finch A, Wedgwood L, Scimone A, Blair IP,

- Parker G, Schofield PR. Life events, first depression onset and the serotonin transporter gene. *Br. J. Psychiatry* 2006, 188: 210-215.
141. Willis-Owen SA, Turri MG, Munafo MR, Surtees PG, Wainwright NW, Brixey RD, Flint J. The serotonin transporter length polymorphism, neuroticism, and depression: a comprehensive assessment of association. *Biol. Psychiatry* 2005, 58: 451-456.
142. Xu Y, Li F, Huang X, Sun N, Zhang F, Liu P, Yang H, Luo J, Sun Y, Zhang K. The norepinephrine transporter gene modulates the relationship between urban/rural residency and major depressive disorder in a Chinese population. *Psychiatry Research* 2009, 168: 213–217.
143. Young SN, Smith SE, Pihl RO, Ervin FR. Tryptophan depletion causes a rapid lowering of mood in normal males. *Psychopharmacology (Berl)* 1985, 87: 173-177.
144. Yu YWY, Tsai SJ, Hong CJ, Chen TJ, Chen MC, Yang CW. Association study of a Monoamine oxidase A gene promoter polymorphism with major depressive disorder and antidepressant response. *Neuropsychopharmacology* 2005, 30: 1719-1723.
145. Zhang K, Xu Q, Xu Y, et al. The combined effects of the 5-HTTLPR and 5-HTR1A genes modulates the relationship between negative life events and major depressive disorder in a Chinese population. *J Affect Disord.* 2009, 114(1-3):224-231.
146. Zalsman G, Huang YY, Oquendo MA, et.al. Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) Polymorphism with stressful life events and severity of depression. *Am J Psychiatry* 2006, 163(9):1588-1593.
147. Zammit S, Owen MJ. Stressful life events, 5-HTT genotype and risk of depression. *Br. J. Psychiatry* 2006, 188: 199-201.



**Encuentros en Neurociencias Vol II**  
Gámiz F, Gallo M & Vives F (eds)



# Instituto Neurociencias Federico Olóriz

Yo no diría que vienen malos tiempos, más bien nos llegan nuevos tiempos. Nos vamos a encontrar con reglas de juego a las que no estamos acostumbrados, ha llegado la hora de adaptarse o morir. Tenemos que olvidarnos del pensamiento ancestral de la cultura agrícola de nacer, vivir y morir en mismo lugar. Tenemos que volver a ser cazadores y buscar el trabajo allí donde esté. Pero quiero dejar claro que mi mensaje es optimista. Tenemos científicos mejor preparados que antes, mejores laboratorios y mejores sistemas de información científica. Somos nosotros los que tenemos que cambiar de mentalidad, no esperar tanto de la política autonómica y central. Por muy buena voluntad que tengan los gobiernos, en nuestro país la financiación tardará años en recuperarse. El secreto va a estar en buscar las subvenciones en organismos internacionales o empresas privadas. Va a ser difícil, sí, pero nos tenemos que acostumbrar a competir frente a candidatos de otros países. Somos como ellos, ni mejores ni peores, y las barreras han sido muchas veces por razones de idioma más que por formación científica. Los investigadores, sobre todo los más jóvenes, no tenemos que capitular sino que tenemos que mantener el motor de la ilusión funcionando al máximo. En estos nuevos tiempos, nuestra voluntad, trabajo, esfuerzo e ilusión serán las únicas llaves que nos permitirán abrir las puertas del campo de la investigación.

Estos diez capítulos son una muestra de las líneas de investigación que se llevan a cabo en los laboratorios de nuestro Instituto. Líneas actuales, que aunque lideradas por investigadores seniors, avanzan gracias al empuje de los miembros más jóvenes, los becarios y contratados que son los auténticos pilares que soportan la investigación y a los que deben dirigirse todas las ayudas.