

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y
Neurociencia

**REGISTRO ELECTROENCEFALOGRÁFICO DE LA ACTIVIDAD ICTAL EN UN
MODELO ANIMAL DE RATONES TRANGENICOS APP/PS1 Y EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEMER**

Karen Reyes Marín

Director de tesis: Dr. Ángel Núñez Molina
Dpto. de Anatomía, Histología y Neurociencia
Universidad Autónoma de Madrid



"Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes."

Santiago Ramón Cajal

"Se ha dicho tantas veces que el problema de España es un problema de cultura. Urge en efecto si queremos incorporarnos a los pueblos civilizados, cultivar intensamente los germen de nuestra tierra y de nuestro cerebro, salvando para la prosperidad y establecimiento patrios todos los ríos que se pierden en el mar y todos los talentos que se pierden en la ignorancia"

Santiago Ramón Cajal

"Para el biólogo, el ideal supremo consiste en resolver el enigma del propio yo."

Santiago Ramón Cajal

"Para mí también"

KRM

AGRADECIMIENTOS

a Franciscus, Gladys, Jovino

Por ser mi constante apoyo e inspiración!

a Torres Alemán

por permitirme trabajar con los animales del laboratorio

a José Luis Cantero

por permitirme estudiar los registros EEG de los pacientes

a todos los profesionales que hicieron posible la culminación

exitosa de este trabajo

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a common age-associated neurodegenerative disorder that is associated with an elevated risk for seizures that may be fundamentally connected to cognitive dysfunction. We used the APP/PS1 mice, model of AD, of 3-9 months of age to study the presence of seizure activity and to establish if the amyloid- β (A β) plaques may affect their generation. The spontaneous EEG of APP/PS1 transgenic mice were similar to wild-type mice. However, they revealed a major incidence of spontaneous seizures and lower threshold to evoke epileptic discharges than control animals when pentylentetrazole (0.5%) was injected. We also found a correlation between the frequency of spontaneous seizures and the number of A β plaques. Application of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-bromobenzylamine (50 mg/kg) generated A β plaques in the cortex and seizure activity appeared. Taken together these data indicate that deposit of A β plaques may be responsible for the epileptic seizures recorded in the APP/PS1 mice. Our findings suggest that a careful EEG study in AD patients could help to diagnosis this pathology

Keywords: interictal spikes, A β plaques, EEG, pentylentetrazole, DSP4, APP/PS1 Mice

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa; este trastorno está asociado con un elevado riesgo de convulsiones que puede estar relacionado con las disfunciones cognitivas que presentan estos enfermos. Utilizamos un modelo de la EA con ratones APP/PS1, de entre 3-9 meses de edad, para estudiar la presencia de actividad epileptiforme y para establecer si el β -amiloide ($A\beta$) pueden afectar su generación. El estudio del EEG de los ratones APP/PS1 fue similar a los de los ratones Wild-type. Sin embargo, revelaron una incidencia de puntas epilépticas espontáneas y un umbral inferior para evocar descargas epilépticas que los animales control cuando se inyectó pentilenotetrazol (0,5%). También encontramos una correlación entre la frecuencia de las puntas epilépticas espontáneas y el número de placas $A\beta$. La aplicación intraperitoneal de N- (2-cloroetil) -N-etil-bromobencilamina (50 mg/kg) generó placas $A\beta$ en la corteza y actividad epileptiforme en ratones Wild-type. En conjunto, estos datos indican que el depósito de placas $A\beta$ puede ser responsable de las crisis epilépticas registradas en ratones APP/PS1. Nuestros hallazgos sugieren que un estudio cuidadoso EEG en pacientes con EA podría ayudar en el diagnóstico de esta patología

Palabras clave: espiga interictal, placas $A\beta$, EEG, pentilenotetrazol, DSP4, ratones APP/PS1

LISTA DE ABREVIACIONES

ABREVIATURAS

Ach	acetilcolina
Aβ	beta amiloide
APP	apolipoproteina
DC	deterioro cognitivo
DCL	deterioro cognitivo leve
DCL am	DCL amnesico
EA	enfermedad de Alzheimer
EcoG	electrocorticograma
EEG	electroencefalograma
DSP4	N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzylamina
WT	wide type

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS

Fig 1	pág. 23
Fig 2	pág. 24
Fig 3	pág. 24
Fig 4	pág. 27
Fig 5	pág. 32
Fig 6	pág. 40
Fig 7	pág. 42
Fig 8	pág. 54
Fig 9	pág. 59
Fig 10	pág. 65
Fig 11	pág. 65
Fig 12	pág. 68
Fig 13	pág. 69
Fig 14	pág. 70
Fig 15	pág. 71

INDICE DE TABLAS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	pág. 57
Tabla 2	pág. 60
Tabla 3	pág. 72

ÍNDICE

1.4.1.3.1.3.	Mecanismos de las crisis epilépticas en la enfermedad de Alzheimer	36
1.4.1.3.1.4.	Tipos de crisis epiléptica en pacientes con enfermedad de Alzheimer	39
1.5.	ESTUDIOS NEUROFISIOLOGICOS: EEG Y MAGNETOENCEFALOGRAFIA	41
1.5.1.1.	Electroencefalografía	41
1.5.1.2.	Magnetoencefalografía	42
2.	PLANTEAMIENTO E HIPOTESIS	45
2.1.	HIPOTESIS	47
2.1.1.	Causalidad entre la Enfermedad de Alzheimer y la Epilepsia	47
2.1.2.	Marcadores Neurofisiológicos de evolución de enfermedad entre EA y DC	47
3.	OBJETIVOS	49
3.1.	OBJETIVOS CONCRETOS	50
3.1.1.1.	Objetivo 1	50
3.1.1.2.	Objetivo 2	50
3.1.1.3.	Objetivo 3	50
3.1.1.4.	Objetivo 4	51
3.1.1.5.	Objetivo 5	51
4.	MATERIALES Y METODOS	52
4.1.	EXPERIMENTOS EN ANIMALES WILD TYPE Y TRANGENICOS APP/PS1	53
4.1.1.1.	Animales de experimentación	53

4.1.1.2.	Condiciones del experimento	53
4.1.1.3.	Normas de trabajo y procedimientos con animales	53
4.1.1.4.	Anestesia	54
4.1.1.5.	Procedimientos a realizar	55
4.1.1.6.	Experimentos con fisostigmina y atropina	56
4.1.1.7.	Experimento con PTZ	56
4.1.1.8.	Experimento con DSP4	56
4.1.1.9.	Estudio anatómico	57
4.2.	ANALISIS DE LOS REGISTROS	57
4.2.1.1.	Criterios de actividad epileptiforme en animales transgénicos	57
4.2.1.2.	Análisis del ECG en ratones	57
4.3.	EXPERIMENTOS EN HUMANOS	58
4.3.1.1.	Estudios realizados en pacientes con DC, EA.	59
4.3.1.2.	Condiciones de los pacientes. Tratado de Helsinki y normas para el estudio con pacientes	59
4.3.1.3.	Registros Electroencefalográficos (EEG)	59
4.3.1.3.1.1.	Variantes de montaje de electrodos	59
4.3.1.3.1.2.	Instrumentos	
4.3.1.4.	Definición y clasificación de descargas interictales	59

4.3.1.4.1.1.	Descargas periódicas	59
4.3.1.5.	Criterios de actividad paroxística e interictal en pacientes con DC y EA..	61
5.	RESULTADOS	64
5.1.	Registro de la actividad ECG	64
5.2.	Actividad de ECG en ratones APP / PS1	65
5.3.	Registros en animales APP	67
5.4.	Efecto de la inyección de PTZ	67
5.5.	Correlación de la actividad interictal y la presencia de placas A β	68
5.6.	Registros de actividad EEG en ratones wild type tratados con DSP4	69
5.7.	Registros EEG de pacientes con EA	70
6.	DISCUSION	73
6.1.	MODELO ANIMAL DOBLE TRANGENICO, ACTIVIDAD EEG BASAL Y ACTIVIDAD EPILEPTIFORME	74
6.2.	ACTIVIDAD ELECTROENCEFALOGRAFICA EN PACIENTES CON EA Y DCL	77
6.3.	Perspectivas al futuro	81
7.	CONCLUSIONES	83
8.	REFERENCIAS	86
9.	ANEXOS	100

9.1. ANEXO I	
9.1.1.1. CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	101
9.1.1.2. ICD-10 DEMENCIA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	103
9.1.1.3. CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE ACTIVIDAD ICTAL E INTERICTAL EN ANIMALES	104
9.2. ANEXO II	105
9.3. ANEXO III	106
9.4. ANEXO IV	107
9.5. ANEXO V	108
9.6. ANEXO VI	109

INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el desorden más común neurodegenerativo asociado a la edad. Está caracterizado por el deterioro de la memoria y el nivel cognitivo. Actualmente no hay terapias efectivas que puedan prevenir, retazar o parar la progresión de la enfermedad.

La EA es la principal causa de demencia en la población y afecta actualmente a 12 millones de personas en todo el mundo; 4,5 millones en Estados Unidos, 700.000 personas en Reino Unido, y la misma cantidad en España, están diagnosticados con EA o enfermedades definidas como demencia, y se espera que esta cifra se duplique en tan sólo una generación o se triplique en 2050. En España se prevé que habrá unos 1.5 millones en el 2050.

En promedio la EA es diagnosticada después que los pacientes presentan un importante deterioro cognitivo. Se cree que la enfermedad ha venido progresando en promedio unos 10 años antes del diagnóstico o comienzo de los síntomas en la mayoría de los pacientes.

Es por esta razón que este periodo representaría un periodo de ventana terapéutica muy importante antes del comienzo en los cambios neurodegenerativos irreversibles.

Se considera que muchos de las técnicas terapéuticas usadas han fracasado porque se inician demasiado tarde o porque la terapia en general no es suficiente.

El costo sanitario por paciente incrementa cada año, debido a que aún no se han encontrado mecanismos de “screening” que permitan identificar de forma temprana la enfermedad y evitar así todas las consecuencias que derivan de un diagnóstico tardío. El tratamiento destinado a pacientes con EA supone a nivel mundial un gasto de 6000.000 millones de dólares. En España es de 37.00 millones de euros anuales.

Este trastorno fue descrito por primera vez por el Dr. Alois Alzheimer en 1901 en una mujer de 51 años de edad, con la pérdida progresiva de la memoria (1). La EA y la demencia son causa principal de discapacidad cognitiva en todo el mundo (2,3).

El origen de la EA es desconocido actualmente. El porcentaje de pacientes con la enfermedad de origen hereditario es menor al 5% y hasta ahora no existe una prueba genética que prediga las probabilidades de padecerlo. Es una enfermedad compleja originada probablemente por una combinación de numerosos factores genéticos y ambientales, sin un patrón de transmisión claro.

La hipótesis más conocida sobre el origen de la EA, señala a la proteína precursora de amiloide (APP) y la proteína tau como responsables. La EA se caracteriza por una acumulación aberrante del péptido β -amiloide (A β), y la pérdida progresiva de sinapsis en el cerebro. La disfunción y pérdida de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y sus proyecciones corticales están entre las primeras manifestaciones patológicas de la EA.

El desarrollo de ratones transgénicos como modelos de la EA permite un estudio controlado de los probables mecanismos de la enfermedad y ensayos terapéuticos. No se ha logrado realizar un modelo experimental de ratón que reúna todos los

aspectos de la EA. Sin embargo, existen líneas de ratones transgénicos que reproducen características de la enfermedad y que hasta el momento logran reproducir parte del proceso en humanos.

Las investigaciones en la EA se han realizado tradicionalmente mediante el estudio de cerebros humanos o mediante la reproducción de lesiones específicas en cerebros de ratas. Sin embargo, la generación de modelos animales transgénicos es de especial relevancia.

Un alto porcentaje de la población mayor de 50 años manifiesta una pérdida subjetiva de memoria con ausencia, en muchos de ellos, de una alteración objetiva de la misma. Se ha sugerido que la EA puede iniciarse como un deterioro cognitivo leve (DCL). Se han analizado los diferentes subtipos de DCL, considerando que sólo algunos de ellos evolucionan en una EA.

A pesar de los avances conceptuales y diagnósticos en el área del envejecimiento desde la perspectiva neuropsicológica, se estima que un porcentaje significativo de los casos de demencia no son diagnosticados en las etapas iniciales.

Los estudios con ensayos clínicos han observado resultados positivos en una clase de fármacos para el tratamiento de Enfermedad de Alzheimer que se dirigen a evitar la acumulación de placa β -amiloide en el cerebro de pacientes con esta enfermedad (4). Los datos presentados en la Conferencia Internacional del Alzheimer 2015, sugieren que estos medicamentos pueden retardar el declive de las personas que reciben tratamiento temprano (4).

1.2. FISIOPATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.2.1. Definición

Es una demencia progresiva y degenerativa del cerebro, que provoca una alteración de las funciones intelectuales. Es el tipo de demencia más frecuente ya que representa un 50-75% de los casos de demencia.

Esta demencia presenta las siguientes características (1,5):

- Es adquirida y global
- Incapacitante y sindrómica

La EA se caracteriza por la degeneración progresiva y específica de las neuronas de la corteza cerebral y de algunas estructuras subcorticales dando lugar al deterioro funcional del cerebro que está determinado por la acción de tres procesos principales:

a. Formación de las placas seniles (los depósitos extracelulares del péptido $A\beta$) y de ovillos neurofibrilares (causadas por fosforilación de la proteína *Tau*) que constituyen las lesiones específicas de la EA (Fig. 1, 2).

b. Alteración en la producción de neurotransmisores; hipofunción de la transmisión colinérgica y glutamatérgica.

c. Apoptosis (muerte celular programada) de neuronas. Pérdida de neuronas (Fig. 3).

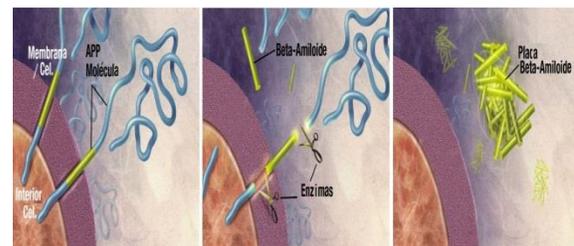


Fig 1. Enzimas actuando sobre la proteína precursora de Amiloides (APP) cortándola en fragmentos de beta-amiloide, los cuales son indispensables para la formación de las placas seniles del Alzheimer. *Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging.*

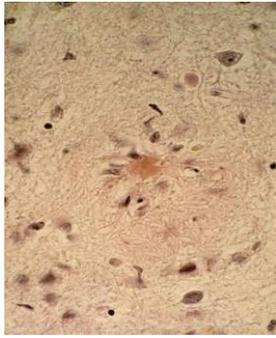


Fig. 2. Corte histológico teñido con rojo congo que muestra en el centro de la imagen un depósito de sustancia amiloide rodeado de células de la microglía que constituye una placa senil cortical (x400). *Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging.*

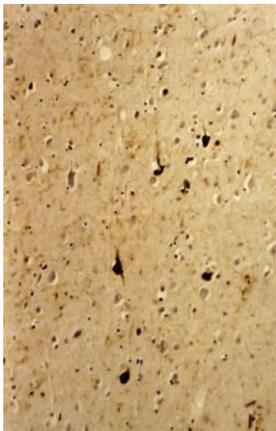


Fig 3. Degeneración neurofibrilar en neuronas de tamaño medio, puesta de manifiesto con inmunotinción para la proteína tau (x250). *Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging.*

1.2.2. Mecanismos patogénicos

La patogénesis de la EA no está completamente dilucidada. En base a estudios en animales y en sujetos humanos, se han descrito una variedad de

mecanismos patogénicos tales como acumulaciones de proteínas anormales (A β y proteína tau), cascadas inflamatorias, respuestas anormales al estrés oxidativo y alteración en el metabolismo oxidativo (5, 6, 7,8).

A nivel molecular, la acumulación de la proteína A β y de la proteína tau en diferentes regiones del cerebro ha sido implicada en la pérdida de funciones sinápticas, metabolismo defectuoso, reparación celular alterada, muerte celular y, por lo tanto, el desarrollo de la EA.

Hiperfosforilación de la proteína tau (proteína asociada a microtúbulos) conduce a la formación de microtúbulos u ovillos neurofibrilares que perjudican el mecanismo de transporte celular y conduce a la muerte neuronal (9).

La proteína precursora amiloide (APP), con loci genéticos en el cromosoma 21, se une a receptores de muerte celular e inicia las vías de apoptosis resultando en la pérdida neuronal (9, 10, 11). Esta hipótesis es compatible con un inicio más temprano de la EA en pacientes con trisomía 21. La acumulación de otras proteínas tales como la presenilina 1, la presenilina 2 y la

apolipoproteína E4/E5, con loci genéticos en los cromosomas 14, 1 y 9, respectivamente, también han sido implicados en la patogénesis de la AD (3, 11).

Estas alteraciones moleculares conducen a la pérdida neuronal y la atrofia cerebral en algunas regiones del cerebro como la región frontal, temporal, parietal, hipocampo y la corteza entorrinal (CE) (3, 9,12).

Además de la pérdida celular en la EA también interrumpe las conexiones neuronales entre las áreas corticales y subcorticales (8). Estas conexiones neuronales se conocen como redes de modo predeterminado, y alteraciones funcionales en estas redes se han relacionado con los déficits de memoria en pacientes con EA (12,13, 14, 15).

Así la EA se puede visualizar como una enfermedad sistémica que afecta a varias redes neuronales en lugar de un trastorno neurodegenerativo localizado. En un estudio reciente, aproximadamente un tercio de los casos de Alzheimer en todo el mundo se han atribuido a factores de riesgo potencialmente modificables, como la mejora del estado de educación, los

factores de riesgo vascular y la depresión (16).

1.2.3. Prevalencia

Su prevalencia va en aumento, debido al envejecimiento de la población, alcanzando en la actualidad cifras del 47% en personas de edad superior a los 85 años (17). Es la cuarta causa de muerte en los países desarrollados tan sólo precedidas por la cardiopatía, tumores e infarto cerebral (18). La incidencia media de la EA es del 7,2% en la población de más de 75 años, y su prevalencia global del 10-15%. La supervivencia media de un paciente con Alzheimer es de 8 años.

La incidencia y prevalencia de la EA aumenta con la edad y es más alta en mujeres. No se han encontrado claras diferencias de prevalencia en diferentes áreas geográficas, siendo las cifras muy comparables en Europa y en Estados Unidos, si se corrigen los datos por edad y sexo. En casos genéticos de EA si se encuentra una familia de origen Colombiano que presentan una alta prevalencia debido al carácter homocigoto

dominante de la enfermedad, pero este es un caso de Alzheimer genético.

El curso natural de la enfermedad es paralelo a los procesos neuropatológicos de pérdida de neuronas y sinapsis, angiopatía amiloidea, placa senil, cambio neurofibrilar de Alzheimer, etc., los cuales suceden antes de que se muestre el deterioro cognitivo de la enfermedad (9). El retraso en el reconocimiento de los síntomas iniciales, unido al hecho de confusión diagnóstica con síntomas de envejecimiento, hace que el diagnóstico precoz de la EA adquiera gran importancia. Para la aplicación de estrategias terapéuticas enfocadas a la prevención y al retraso de la evolución de EA, la búsqueda de marcadores biológicos potenciales para el diagnóstico precoz es fundamental (19).

1.3. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer son los siguientes (1):

a. Edad: Es el factor de riesgo más importante para sufrir Alzheimer. Hay una unanimidad que existe un aumento exponencial de las cifras de incidencia y

prevalencia a medida que se cumplen años, siendo del 2% entre la población de 65-69 años, llegando al 32% entre los ancianos de 85-89 años.

b. Género: Las mujeres tienen un riesgo relativo superior de padecer esta enfermedad.

c. Genéticos: Las alteraciones genéticas son importantes en la aparición precoz del Alzheimer. Se ha observado que mutaciones en cualquiera de los tres genes siguientes:

APP (proteína precursora del amiloide) y presenilinas 1 y 2 (PS-1, PS-2); son responsables de algunos casos de enfermedad de Alzheimer precoz, es decir, de aparición antes de los 60 años. Su transmisión es autosómica dominante. El alelo ϵ -4 del gen de la lipoproteína E (Apo E) está asociado con un incremento en el riesgo de enfermedad de Alzheimer esporádica.

d. Tóxico-ambientales: El tabaco es un factor de riesgo.

e. Nutricionales: La hipercolesterolemia, la deficiencia de vitamina B12 y de folatos, la obesidad, una dieta sin antioxidantes así como el alcoholismo son factores de riesgo para el Alzheimer

f. Sanitarios: La depresión, la hipertensión, la hiperhomocistinemia, la menopausia y la andropausia son factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer.

g. Socioeconómicos y culturales (19): Hay datos epidemiológicos consistentes a favor de cuanto mayor sea el nivel educativo que se alcanza en la vida, menor será la probabilidad de sufrir demencia en edades avanzadas (especialmente en mujeres). Es decir, a mejor educación y estado socioeconómico, menor enfermedad de EA.

1.4. HIPOTESIS SOBRE EL ORIGEN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: Modelos animales

La hipótesis más conocida sobre el origen de la EA, señala a las proteínas precursora de amiloide (APP) y tau como responsables. La EA se caracteriza por una acumulación aberrante del péptido A β , y la pérdida

progresiva de sinapsis en el cerebro. La disfunción y pérdida de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y sus proyecciones corticales están entre las primeras manifestaciones patológicas de la EA.

El desarrollo de ratones transgénicos como modelos de la EA permite un estudio controlado de los mecanismos de la enfermedad y pruebas terapéuticas. Los primeros modelos transgénicos de la EA vinieron de la sobreexpresión de la proteína precursora A β en un intento de reproducir la patología amiloide. La APP se procesa por dos vías metabólicas, una fibrillogénica que conduce a la formación de placas y la otra no fibrillogénica (Fig. 4 y 5).

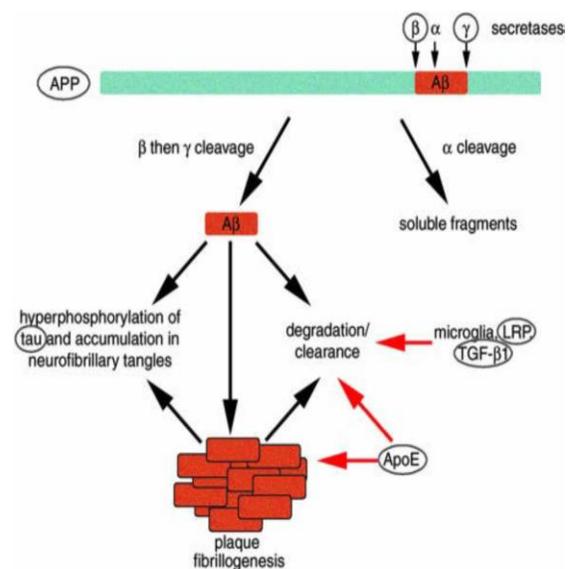


Fig. 4. Esquema de la vía metabólica de la formación de placas de A β según Spiers and Hyman 2005.

Hay varios tipos de modelo de EA en ratones. En uno de los más estudiados, el ratón APP sobreexpresa formas mutadas de la APP humana (20, 21,22), lo que provoca el desarrollo de placas de A β en la neocorteza y en el hipocampo hacia los 10 meses de edad. Un depósito más acelerado de las placas de A β se produce en un segundo tipo de modelo animal, en el cual los ratones (APP-PS1) coexpresan PS-1 y proteínas APP humanas mutadas (69) con lo que las placas de A β empiezan a aparecer a los 3 meses de edad.

Las mutaciones de APP están asociadas con EA familiar y un aumento de β -amiloide, un producto de degradación de APP. El amiloide se acumula en las placas seniles, neuritas distróficas, y terminales sinápticas en el cerebro con EA (21). Por lo tanto, muchos grupos han trabajado bajo la teoría de que sobreexpresión de APP o fragmentos de APP bajo promotores específicos de neuronas pueden resultar en la patología amiloide similar a la observada en la EA. Después de varios intentos infructuosos

para crear un modelo de ratón de EA en la década de 1990, actualmente existen alrededor de una docena de modelos de ratón, que desarrollan la patología amiloide debido a la sobreexpresión de APP.

Games y colegas (22) informaron de un modelo de ratón convincente de EA, el ratón PDAPP, en 1995. Ratones PDAPP sobreexpresan ADNc de la APP humana con porciones de intrones APP 6-8 y con valina en el residuo 717 sustituido por Fenilalanina-uno de la FEA asocia mutaciones bajo el control del promotor del factor de crecimiento β derivado de plaquetas (PDGF β). Estos ratones, a diferencia de los modelos anteriores APP controlados por un promotor NSE, (23,24) expresan niveles muy altos de proteína APP (~ 10 veces más alta que endógeno APP), y desarrollan más neuropatología de Alzheimer como placas neuríticas, neuritas distróficas, gliosis y pérdida de la densidad de sinapsis (22, 25). En particular, la formación de placas en estos ratones es fundamentalmente en el hipocampo (a los 6-8 meses) o en las zonas corticales y límbicas (8 meses) de una manera progresiva, mostrando una especificidad

regional como se observa en la patología de la EA (22,26).

La patología amiloide en ratones PDAPP es sorprendentemente similar a la observada en la EA. Comparaciones ultraestructurales revelan fibrillas de amiloide de tamaño similares, placas similares asociada a neuritas distróficas que contienen componentes sinápticos y neurofibrillas, asociaciones de microglía con las placas, y la fosforilación de la proteína tau y neurofilamentos en las neuritas en ratones de edad (18 meses) (22,27). Sin embargo, estas alteraciones neurodegenerativas no van acompañados de la formación de filamentos pareados helicoidales, y el análisis estereológico por Irizarry y col. no mostraron pérdida neuronal global en la corteza entorrinal, CA1, o la corteza cingulada hasta los 18 meses de edad (26).

En 1996, Hsiao y col. publicaron otro modelo de ratón que sobreexpresa APP de la EA, la línea Tg2576. Estos ratones son transgénicos para ADNc de la APP humana con la mutación sueca doble (K670N y M671L) bajo el control del promotor de la proteína prión de hámster (PrP). Los ratones heterocigotos Tg2576 producen APP en 5.5

veces por encima de los niveles endógenos y desarrollan placas difusas y neuríticas en el hipocampo, la corteza cerebral, subiculum, y el cerebelo en alrededor de 9-11 meses de edad, similares a los observados en la EA y ratones PDAPP. En las tareas de alternancia y laberinto de agua, los ratones Tg2576 mostraron déficits de memoria relacionados con la edad comenzando alrededor de los 8 meses de edad (28). También tienen un fenotipo electrofisiológico dependiente de la edad; en edades más avanzadas se caracterizan por alteración de la inducción de LTP en el hipocampo, en registros *in vitro e in vivo* (29). En la corteza, la integración sináptica también se ve afectada en vivo (30). Estas alteraciones funcionales pueden ser la base de algunos de los déficits de memoria observados. Las placas en ratones Tg2576 están asociados con neuritas distróficas y gliosis, pero sin pérdida global de sinapsis o neuronas en CA1 (31). Recientemente, Lanz et al. (32) informaron de que la densidad de la espina dendrítica disminuye en CA1 de los dos ratones PDAPP y Tg2567 antes de deposición de la placa, lo que demuestra que estos modelos pueden emular algunos

de los circuitos sinápticos interrumpidos, como se ha visto en la EA.

Ratones APP23, desarrollados en Novartis, sobreexpresan ADNc de la APP humana con la mutación sueca bajo el control del promotor murino Thy 1.2. Estos ratones desarrollan placas amiloides y la angiopatía amiloide cerebral a partir de 6 meses de edad (33). De manera similar a los modelos descritos anteriormente, los ratones APP23 desarrollan déficits de memoria según la evaluación de las pruebas de comportamiento (34,35). Otra línea que sobreexpresa APP de ratón con la mutación sueca, desarrollado por Borchelt et al (36,37) no desarrolla placas hasta 18 meses (línea APP Swe C3-3). El transgén es impulsado por un promotor diferente (prion promotor de ratón) y está en una cepa de fondo diferente (C57BL/6-C3H) a partir de los modelos Tg2576 y APP23 mencionados anteriormente que tienen un inicio más temprano de la deposición de amiloide.

La expresión de tanto la mutación sueca y la mutación V717F dirigido por el promotor prion de hámster sirio (modelo de ratón TgCRND8) provoca la deposición temprana de amiloide en placas y muerte prematura

que dependen de la cepa de fondo de ratón (38,39), que indica la importancia de los antecedentes genéticos en los efectos de los sobreexpresión de APP.

Los modelos anteriores muestran claramente que la sobreexpresión de APP humano con mutaciones EA-asociado familiares puede recapitular gran parte de la patología amiloide visto en EA; sin embargo, las mutaciones de APP causan sólo una pequeña fracción de casos de EA. Las mutaciones en las PS-1 y 2 también causan EA familiar (40), probablemente alterando el procesamiento de APP para favorecer la producción de β A y, en particular, especies fibrilogénicas. Mutaciones asociadas a presenilina-FAD se han usado para generar modelos animales. Cruzando los ratones Tg2576 con PS1 M146L ratones mutantes (modelo PSAPP) también provoca una elevación de los niveles de β A 42/ Ap 40 y una aceleración en el depósito de amiloide, evidente a los 6 meses de edad, en comparación con 9 meses en ratones Tg2576 (41).

La evidencia de que la co-expresión de PS1 con APP acelera el depósito de la placa y que la expresión de PS1 por sí sola no es

suficiente para inducir la patología amiloide apoya el papel de PS1 como un gen importante.

Mutaciones FAD-asociado de presenilinas causan un aumento de la probabilidad de producir la versión 42 de aminoácidos altamente fibrillogénico de β -amiloide, en lugar del péptido de 40 aminoácidos, menos perjudiciales. Esto haría que las presenilinas fueran unas dianas prometedoras para el desarrollo de medicamentos para disminuir la deposición de amiloide en la EA.

Sin embargo, ratones knock-out para la presenilina 1 no son viables y desarrollan un fenotipo anómalo en el esqueleto y en el sistema nervioso central (42), indicando la importancia de este gen durante el desarrollo.

La empresa Cephalon ha desarrollado recientemente un modelo de rata transgénica de triple APP/PS-1 de la EA, con un curso temporal y una deposición de β A, similar a la observada en ratones Tg2576 (43). Se han desarrollado otros modelos de ratas transgénicas (44,45), pero el modelo de rata de Cephalon es el primero en mostrar la presencia de placas de β A patológicas. Este modelo puede resultar

muy útil para la investigación porque las ratas son sujetos mejores que los ratones en varios tipos de experimentos tales como las pruebas de comportamiento de la función cognitiva y registros electrofisiológicos.

En resumen, estos modelos animales han permitido, por ejemplo, determinar que en los ratones doble transgénicos APP/PS-1 la densidad de los receptores muscarínicos disminuye, lo que conlleva a un deterioro relacionado con la edad, que provoca una disfunción del acoplamiento receptor muscarínico-proteína G (46). Esta pérdida de receptores muscarínicos también juega un papel sustancial en el deterioro cognitivo que se observa en estos pacientes, caracterizado por la pérdida de memoria, capacidad de aprendizaje y atención conductual.

La pérdida a gran escala de las neuronas altera los circuitos neuronales y debe contribuir a la disminución cognitiva que se observa en la EA. Las neuronas piramidales, origen de proyecciones corticocorticales entre otras muchas conexiones, son particularmente vulnerables, y su muerte interrumpe conexiones entre las cortezas de asociación (47). Por ejemplo, hasta el 90%

de las grandes neuronas piramidales en la corteza prefrontal se pierden en las etapas finales de la enfermedad (48). La conexión de la corteza entorrinal y la formación del hipocampo también se reducen en la EA; esta vía proporciona información de las cortezas de asociación para su procesamiento en el hipocampo y se considera que juegan un papel crucial en la memoria (49).

Incluso en un nivel leve de EA, el 50% de las neuronas de la capa II de corteza entorrinal se pueden perder, y en casos severos, casi todas las neuronas en esta capa han degenerado (50). En la región CA1 del hipocampo, alrededor de 70% de las neuronas mueren durante la progresión de la EA (51).

Las neuronas que permanecen en el cerebro con EA muestran cambios morfológicos muy importantes. Forman neuritas distróficas, sus árboles dendríticos y axonales son remodelados, y cambia la densidad de las sinapsis y espinas dendríticas (52). Estos cambios alteran la conectividad en circuitos responsables de la memoria y la cognición, probablemente contribuyendo a los síntomas de EA. En

efecto, la pérdida de sinapsis se correlaciona fuertemente con el deterioro cognitivo en los pacientes (53).

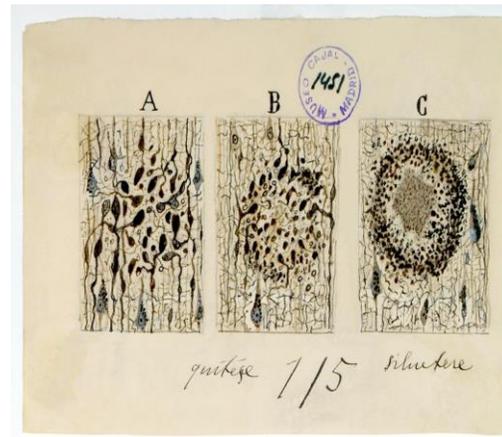


Fig 5. Anatomía patológica, cambios asociados a la formación y acumulación de la proteína A β . Santiago Ramón y Cajal. Cortesía Juan De Carlos, Instituto Cajal.

1.4.1.1. Deterioro cognitivo

El termino deterioro cognitivo leve (DCL) se utiliza para caracterizar un cuadro clínico que generalmente se presenta durante el envejecimiento y consiste en la disminución de una o más funciones cognitivas sin afectación en las actividades de la vida diaria. Esta entidad es heterogénea y puede estar determinada por sus características clínicas (54). De esta forma, se clasifica el DCL en tres tipos: amnésico (alteración específica de la memoria), el de múltiples dominios (fallos en la memoria y otras

funciones cognitivas), y alteración en un dominio cognitivo diferente a la memoria (alteración importante de otra función cognitiva). El diagnóstico adecuado de DCL tiene implicaciones clínicas importantes, pues se comporta como un posible predictor de alteraciones cognitivas progresivas que podrían sugerir el inicio de un cuadro demencial (Anexo I). El DCL de tipo amnésico (DCLamn) es el más asociado con un estadio previo a la demencia de tipo Alzheimer (DTA) (Anexo I). Para hacer el diagnóstico de DCLamn, se deben corroborar las quejas o fallos en la memoria por un informante diferente al paciente, y el déficit se debe objetivar a través de pruebas neuropsicológicas; además, el paciente debe presentar un funcionamiento cognitivo general normal, que le permite ser competente y autónomo en las actividades de la vida diaria, es decir, no reúne criterios para el diagnóstico de demencia (54). Diferentes estudios realizados sobre esta entidad plantean que el DCL-amn supone un riesgo de presentar demencia en aproximadamente un 12% de la población por año, mientras que en personas sanas, la tasa de conversión a demencia está entre el 1-2% anual (54). La prevalencia del DCL-

amn varía de un estudio a otro, y se estima entre el 3-17% de la población mayor de 65 años (55,56).

El grupo de trabajo del *European Consortium on Alzheimer's Disease* (EADC) sobre Deterioro Cognitivo Leve realizó en marzo de 2006 una revisión crítica del concepto, proponiendo un procedimiento nuevo de diagnóstico con tres pasos diferenciados, ANEXO 1E.

1.4.1.2. Epilepsia

La epilepsia según la "International League Against Epilepsy" (ILAE) "es un trastorno cerebral que se caracteriza por una predisposición duradera para generar ataques epilépticos y consecuencias neurobiológicas cognitivas, psicológicas y sociales. La definición de la epilepsia requiere la ocurrencia de al menos un ataque epiléptico".

La epilepsia puede ser producida por muy diversos factores: lesiones cerebrales, infecciones, enfermedades vasculares o degenerativas, tumores, etc. Incluso el abuso del alcohol o de algunas drogas puede ser la causa. Se ha encontrado además un componente genético en el 40% de los pacientes.

Su presencia podría ser fácilmente reconocida y tratada. La epilepsia se define conceptualmente en el 2005 como un trastorno del cerebro que se caracteriza por una predisposición duradera para generar ataques de epilepsia.

Esta definición es generalmente prácticamente aplicada a dos convulsiones no provocadas con >24h de diferencia. El internacional League Against Epilepsy (ILAE) aceptó las recomendaciones de un grupo de trabajo que altera la definición práctica para circunstancias especiales que no cumplen con los criterios de convulsiones.

Sin embargo teniendo en cuenta los problemas durante el diagnóstico para situaciones especiales la ILAE ha tenido en cuenta las recomendaciones del Task force y los ha considerado dentro de los criterios diagnósticos (Anexo F): Definición de epilepsia según la ILAE 2014.

1.4.1.3. Alzheimer y Epilepsia

La epilepsia y la EA son enfermedades neurológicas que se presentan en el adulto mayor porque constituyen un factor de riesgo para ambas enfermedades aunque aún no está claro si comparten también

algún mecanismo fisiopatológico (57,58). Sin embargo, la EA de forma aislada podría constituir un factor de riesgo de epilepsia en este grupo poblacional (59). Se han postulado tres hipótesis que intentan explicar los mecanismos que generan crisis epilépticas y compromiso cognitivo; uno de ellos está en relación a los péptidos y proteasas involucradas en la síntesis del βA , que por diversos mecanismos influiría en la hiperexcitabilidad neuronal, además la pérdida de la inhibición por disminución de la expresión de los canales de sodio Nav1.1 en las interneuronas gabaérgicas y los cambios que producen los ovillos neurofibrilares en la corteza de cerebral de pacientes con EA y epilepsia generarían también compromiso cognitivo(60,61,62).

Reconocer la presentación clínica de las crisis epilépticas en un paciente con EA es una tarea difícil de realizar debido a que el comportamiento inusual de los pacientes con esta enfermedad podría confundirse con la presentación de crisis epilépticas parciales complejas constituyendo un reto el diferenciar episodios epilépticos de los no epilépticos (síncopes, episodios de amnesia

global transitoria, ataques isquémicos transitorios, trastornos del sueño, ansiedad, trastornos metabólicos o tóxicos)) (63); o simplemente presentar crisis epilépticas no convulsivas; es por ello que el electroencefalograma podría ser una herramienta útil, que apoye el diagnóstico.

La importancia de reconocer e iniciar tratamiento temprano en pacientes con EA y epilepsia, radica en que estos pacientes tienen mayor deterioro cognitivo y peor calidad de vida si las crisis epilépticas no son tratadas de forma oportuna y adecuada (64,65).

1.4.1.3.1.1. Factores de riesgo de crisis epilépticas en la enfermedad de Alzheimer

Los pacientes con EA y otras demencias tienen entre 5-10 veces más riesgo de desarrollar crisis epilépticas en el curso de la enfermedad comparado con personas saludables de la misma edad y en ausencia de otros daños neurológicos (66,67); pero existen otros factores de riesgo específicos en la EA que predisponen la presencia de crisis epilépticas como los que mencionamos a continuación.

El diagnóstico de epilepsia precede o coincide con el diagnóstico de la EA en aproximadamente un 51 %; por lo que la presentación de epilepsia sería independiente del estadio de la enfermedad (59,64). Los pacientes menores de 65 años de edad que desarrollan epilepsia en el curso de la EA, tuvieron deterioro cognitivo 5 ó 7 años antes que los pacientes que no desarrollan epilepsia; además presentan mayor severidad de demencia (68); estos hallazgos son similares a los encontrados en pacientes con actividad epileptiforme subclínica, demostrada por el registro del electroencefalograma.

1.4.1.3.1.2. Factor genético

La EA familiar autosómica dominante es causada por la mutación del gen de la presenilina1 en el cromosoma 14, la mutación más frecuente es la E280A; dentro de su fenotipo clínico se podría incluir a las crisis epilépticas y es por ello que es considerada un factor de riesgo en esta población; e incluso algunos autores sugieren añadirla a la lista de epilepsias genéticas (69).

Otros factores de riesgo o causas raras para EA de inicio temprano son las mutaciones

de la presenilina 2 (mutación N141I) y las duplicaciones de la proteína precursora del amiloide (70). Las formas genéticas de la EA tienen en común el procesamiento y acumulación anormal del β A; pero a pesar de esta relación aún no está claro si la incidencia de epilepsia es mayor en el grupo de EA familiar o la EA esporádica (71). Sin embargo en el grupo de pacientes con síndrome de Down (trisomía 21) que tienen alteraciones del procesamiento de la proteína precursora del amiloide se ha encontrado mayor frecuencia de demencia tipo Alzheimer en mayores de 40 años y en esta población es conocida la alta incidencia de crisis epilépticas (72).

Otro factor de riesgo genético es la presencia de por lo menos un alelo ϵ 4 de la apolipoproteína E, el cual es considerado un factor de riesgo para la EA; a su vez está asociada con el incremento de la excitabilidad de las redes neuronales, sobre todo en la actividad epileptiforme subclínica en pacientes sin demencia, pero esta disfunción podría influir también en el establecimiento de la cascada patogénica de la EA considerándose un factor de riesgo para EA y epilepsia aún en estudio (73).

El sexo y la raza también se están considerando como factores de riesgo. Un estudio retrospectivo realizado en la población italiana encontró que la frecuencia de crisis epiléptica fue tres veces mayor en varones que en mujeres; sin embargo este hallazgo no fue significativo, (57). La etnia afroamericana ha sido también considerada un factor de riesgo para el desarrollo de crisis epilépticas en la enfermedad de Alzheimer (74, 75).

1.4.1.3.1.3. Mecanismos de las crisis epilépticas en la enfermedad de Alzheimer

El deterioro cognitivo asociado a crisis epilépticas puede presentarse en diferentes escenarios: la epilepsia del lóbulo temporal podría generar per sé compromiso de memoria e incluso manifestarse como una demencia franca y así ser diagnosticada como EA erróneamente (76). Además, el tratamiento antiepiléptico podría también producir deterioro cognitivo. Ambas, epilepsia y deterioro cognitivo comparten mecanismo específicos subyacentes que generan alteraciones de la excitabilidad neuronal, esta teoría se basa en el hecho que las crisis epilépticas se pueden

presentar al inicio o en estadios tardíos de la EA (60,77). La pérdida neuronal y la reorganización de los circuitos neuronales en el lóbulo temporal, en las estructuras CA1, subículo del hipocampo y la corteza entorrinal que aparecen en la EA conducirían a una hiperexcitabilidad patológica que generaría las crisis epilépticas. Otros estudios han encontrado hiperperexcitabilidad en las neuronas piramidales de otras áreas de la neocorteza, lo que sugiere que la epileptogénesis en la EA podría no estar limitada al lóbulo temporal medial e hipocampo (71). Pese a estos hallazgos los mecanismos de hiperexcitabilidad en el cerebro de los pacientes con EA no es ampliamente conocido, en ese sentido, se ha observado que estudios realizados en pacientes con EA de inicio temprano y patrón de herencia autosómica dominante presentan anomalías en el metabolismo de la proteína precursora del amiloide que generan péptidos que a su vez influyen en diferentes aspectos de la función neuronal como el incremento de la excitabilidad; además estas anomalías en la excitabilidad neuronal se ven potenciadas por mutaciones en la presenilina 1 o la

presenilina 2; lo que muestra que las crisis epilépticas son parte de la historia natural de la enfermedad (78).

Mediante la utilización de modelos animales de epilepsia y EA, se postulan tres hipótesis para intentar explicar los mecanismos por el cual se generan las crisis epilépticas. Uno de ellos expone que todos los péptidos y proteasas involucradas en la síntesis del β A por diversos mecanismos influirán en la hiperexcitabilidad neuronal (61). La EA de inicio temprano es causada por mutaciones en la proteína precursora del amiloide, lo que desencadena un procesamiento proteolítico alterado y la producción de péptido amiloide aberrante; la acumulación progresiva de estos péptidos en diferentes regiones cerebrales como el hipocampo contribuiría al deterioro cognitivo en la EA, pero también a la hiperexcitabilidad neuronal y remodelamiento del circuito inhibitorio; estudios en ratones transgénicos mostraron que los niveles elevados de β A en el cerebro pueden causar actividad epileptiforme aun en estadios tempranos de la EA y en ausencia de pérdida neuronal (73,79,80).

No está claro como los depósitos del β A contribuyen al daño neuronal; pero si es conocido que la exposición a niveles patológicamente relevantes inducen hiperexcitabilidad neuronal y deterioro cognitivo, cambios patológicos observados en la EA y actividad epileptiforme espontánea (81).

Otro mecanismo está basado en la mutación del gen Nav1.1 que produce la disminución de la expresión de los canales de sodio Nav1.1 en las interneuronas gabaérgicas que resultan a su vez en una pérdida de la inhibición que conlleva a generar crisis epilépticas; es así que la administración de drogas antiepilépticas bloqueadoras de canales de sodio en estos ratones exacerban las crisis epilépticas y empeoran la cognición; además esta mutación del Nav1.1 es vista en dos síndromes epilépticos genéticos; la epilepsia generalizada con convulsiones febriles y la epilepsia mioclónica severa de la infancia y de allí su relación como mecanismo de epilepsia y EA (81,82). Dentro de este mecanismo que involucra a los canales de sodio las acciones de BACE1 una enzima limitante de la velocidad con la que se produce el β A y que a su vez actúa en la sub

unidad β 2 de los canales de sodio, se encuentra marcadamente incrementada en cerebros de pacientes con EA, es decir que su sobreexpresión hace que Nav1.1 sea retenido intracelularmente, lo que lleva a la reducción de los niveles superficiales de Nav1.1, disminución de las corrientes de sodio y deterioro en los potenciales de acción. El canal Nav1.1 es altamente expresado en el subtipo de interneurona gabaérgica que ejerce una inhibición potente sobre las células principales. Por lo tanto, una pérdida de funcionalidad del Nav1.1 puede contribuir a la desinhibición de las redes corticales y contribuir a la hiperexcitabilidad neuronal (60,83). El último mecanismo está en relación al papel que juega la proteína tau, una proteína asociada al microtúbulo que está implicada en la patogénesis de la EA; los ovillos neurofibrilares son agregados intracelulares de proteína tau anormalmente hiperfosforilada, que a su vez genera proliferación de astrocitos reactivos y de microglía en la corteza cerebral, pero sobre todo en el hipocampo, estos hallazgos son encontrados en pacientes con EA y en pacientes con epilepsia lo cual generaría una actividad epiléptica (62) . La reducción

de la proteína tau observada en ratones no transgénicos no produjo cambios en las tareas de aprendizaje y memoria a la vez que interfiere en la severidad de la crisis epiléptica; basado en estos hallazgos, esta reducción de la proteína tau podría ser una clave para la intervención terapéutica de la epilepsia (61, 84,85).

1.4.1.3.1.4. Tipos de crisis epiléptica en pacientes con enfermedad de Alzheimer

La identificación de los tipos de crisis epilépticas en pacientes con EA resulta complicada debido a que los pacientes tendrán dificultades para reportar o recordar las crisis epilépticas. Pueden presentarse tanto crisis epilépticas generalizadas como parciales complejas (81); el tipo más frecuente de crisis epilépticas en los pacientes con EA son las crisis parciales complejas; las crisis no convulsivas como el “jamais vu”, “deja vu”, fenómenos sensitivos, fenómenos psíquicos, pérdida del habla y amnesia (64); otros estudios indican que las crisis epilépticas más frecuentes son las crisis parciales con generalización secundaria (en 13/145 pacientes con EA) (86). También se

han descrito otros tipos de crisis epilépticas como las crisis parciales simples y las mioclónicas, estas últimas observadas en pacientes con EA y síndrome de Down en el adulto (87,88).

El electroencefalograma no es un examen que se realice de forma rutinaria en los pacientes con EA, pero de los registros electroencefalográficos realizados en estos pacientes mostraron en menos de la mitad de ellos un patrón típico de anomalías como un enlentecimiento (ondas theta y delta) o descargas interictales corticales (puntas, punta onda). Es posible que esta baja frecuencia se deba a que el registro de la actividad eléctrica cerebral del lóbulo temporal medial es difícil. Además, los electroencefalogramas realizados en estos pacientes no son prolongados ni realizados con electrodos profundos o intracraneales (78,89). Estos estudios mostraron un enlentecimiento no especificado en el 50% de los casos y solo un 36% mostró puntas u ondas epileptiformes. Es importante señalar que los pacientes con EA sin crisis epilépticas también pueden presentar enlentecimientos no especificados (86). El foco epileptógeno reportado con mayor frecuencia es de origen unilateral y a nivel

temporal, seguido de la región frontotemporal (64); estos registros hallados en pacientes con EA sin evidencia clínica de crisis epilépticas predicen la presencia de estas en el cuadro clínico (75).

La presencia de crisis epilépticas en la enfermedad de Alzheimer puede presentarse en cualquier estadio de la enfermedad, pero en las formas de EA de inicio temprano se presentaría en pacientes que iniciaron el deterioro cognitivo en edades menores a 65 años.

El análisis cuantitativo del EEG (qEEG), a diferencia del clásico análisis visual, ha aportado nuevas utilidades a esta técnica. Recientemente se ha demostrado que el estudio qEEG puede ser de utilidad para ayudar a diferenciar Demencia por Cuerpos de Lewy y EA. En concreto la puntuación GTR (Grand Total EEG), que es un sistema automático de puntuación de las anormalidades del EEG, aporta una sensibilidad superior al 72% y una especificidad del 85% (90).

Los análisis EEG tradicionales nos hablaban de un aumento «difuso» de la actividad de baja frecuencia en la EA. Sin embargo, Fernández et al. (91) describieron un

aumento significativo en las fuentes de actividad delta localizado en la corteza parietal y temporal que correlacionaba con el estatus cognitivo y funcional de los pacientes (Fig. 6). En un estudio posterior (92) se comprobó que este aumento focal de la actividad delta correlacionaba de forma muy significativa con uno de los signos tradicionales de la EA como es la atrofia cortical y en particular la disminución del volumen del hipocampo. La combinación de ambas medidas (número de fuentes delta y disminución del volumen del hipocampo) permitían la distinción de pacientes y controles con una capacidad discriminativa global del 87,1% (93,3% de sensibilidad y 81,2% de especificidad).

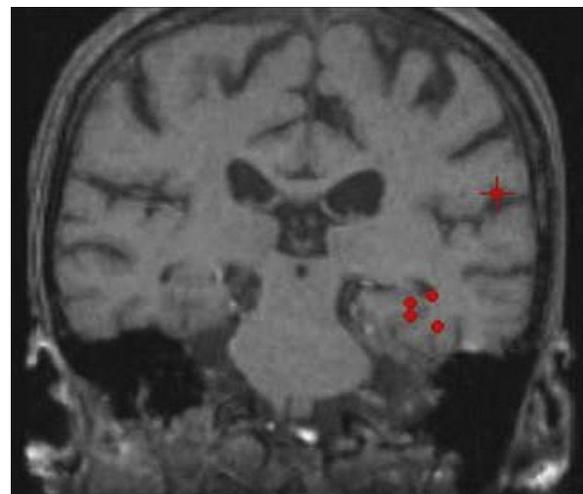


Fig. 6. Actividad delta focal temporoparietal en la enfermedad de Alzheimer (EA). Los puntos rojos indican las fuentes u orígenes de esta actividad. Este patrón de

actividad no solo distingue a los pacientes de los ancianos sanos, sino que un aumento de la actividad delta parietal posterior en pacientes DCL. Fuente: figura tomada de Fernández et al. (91).

1.5. ESTUDIOS NEUROFISIOLOGICOS. EEG Y MAGNETOENCEFALOGRAFIA

Los estudios experimentales y teóricos de la conectividad funcional cerebral en seres humanos requieren técnicas no invasivas tales como la electroencefalografía EEG (ANEXO H), la magnetoencefalografía (MEG), y proyección de imagen de resonancia magnética funcional (fMRI). Entre éstos, el EEG y la MEG proveen una medida más directa de la actividad cortical con una alta resolución temporal (<1 milisegundo), pero con una resolución espacial (1-10 cm) limitada por la localización de los electrodos en el cuero cabelludo. En cambio, MRI funcional tiene una resolución temporal baja (1-10 segundos), pero tiene alta resolución espacial (1-10 milímetros).

La actividad funcional entre regiones del cerebro en la corteza se pueda definir como una grande red en el cerebro con nodos difusos, la fMRI puede delinear la anatomía

de estas redes, quizás más eficazmente en la identificación de ejes de las redes más importantes. Mucho esfuerzo actual se dirige la integración de estas tecnologías y de otras, por la razón obvia: para proporcionar una vista más completa de la actividad dinámica espacial y temporal del cerebro.

En animales, la investigación se ha centrado en el estudio de la actividad de una o unas pocas neuronas, usando medidas directas con electrodos. Aunque las medidas de EEG integren la actividad de un gran número de neuronas, hay numerosas pruebas que indican que permiten determinar los cambios de actividad neuronal en poblaciones neuronales.

1.5.1.1. Electroencefalograma

Las señales del EEG se registran en términos de cambios de voltaje entre dos electrodos colocados en el cuero cabelludo de un sujeto o con referencia a un electrodo de referencia. Hans Berger (1930) fue el primer en estudiar estas señales y como cambiaban en diferentes estados. El estándar actual para la colocación de los

electrodos es el Sistema Internacional 10-20 (Fig. 7).

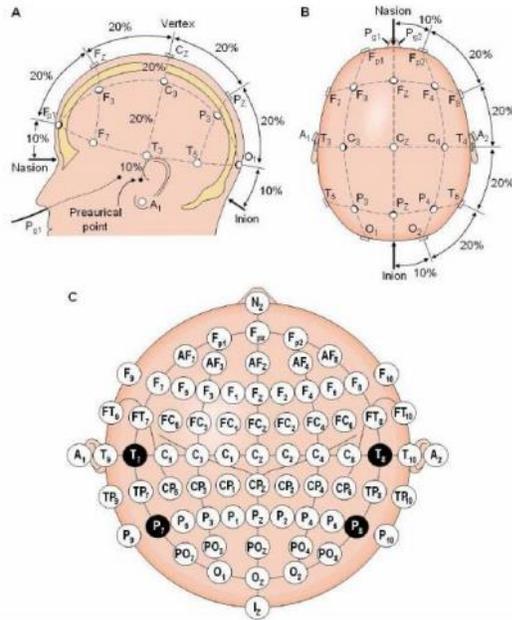


Fig. 7. Diferentes perspectivas del Sistema Internacional 10-20 en la colocación de electrodos (A) plano sagital; (B) plano axial; y (C) localización de una configuración de 64 electrodos. (Adaptado de Malmivuo, 1995).

Se nombra a los electrodos por su localización en el cuero cabelludo (F para el frontal, C para la central, T para temporal, P para parietal, y O para occipital) y son numerados de modo que los electrodos denominados Z (cero (zero en inglés) se encuentran en la línea media, los electrodos impares están en el hemisferio izquierdo y los electrodos pares están a la derecha. El EEG es profundamente influenciado por alteraciones en vigilancia y también cambia

con edad, más perceptiblemente durante la infancia.

1.5.1.2. Magnetoencefalografía

Este tipo de registro permite medir los campos magnéticos asociados a la actividad eléctrica neuronal. Mediante la magnetoencefalografía se puede determinar qué cambios en la amplitud de la banda de frecuencias 2-4 Hz (banda delta) y entre los 16 y los 28Hz (alcanzando el rango más alto de la frecuencia beta y el inicio de gamma) permitían distinguir enfermos de EA y sujetos control de la misma edad, con una sensibilidad del 81% y una especificidad del 80%. Estos resultados nos llevan a considerar el papel de las frecuencias bajas como «signo» de la EA y del DCL (93). De hecho estos resultados obtenidos con MEG confirman estudios previos EEG en los cuales se ha detectado una disminución de la actividad de alta frecuencia en la EA, generalmente dentro de un espectro de 12-30Hz (93). Otros autores han demostrado cambios en la banda de frecuencias 14-22Hz (93), la banda 20-28Hz (94), la banda beta1 (95), la banda beta2 (96), o en la banda de 18-22Hz

(97). Esta modificación de la actividad cerebral no solo puede describirse en términos de cambios en la frecuencia de la actividad, sino también en cuanto a variaciones en la localización de los generadores de dicha actividad. Los estudios de EEG revelan una pérdida de la actividad beta en regiones parietales y centrales (98). Cuando se realizan análisis de dipolo único en registros de EEG de EA nos encontramos con que la actividad alfa y beta se va localizando de una forma cada vez más anterior, disminuyendo en las zonas más posteriores, conforme progresa la enfermedad y esta se hace más severa (98). Estos datos del EEG correlacionan con estudios PET donde se muestra un hipometabolismo en las áreas posteriores del cerebro que va progresando con el curso de la enfermedad (99).

Las variaciones observadas en el EEG de los enfermos de EA y de los pacientes con DCL tienen en común el aumento de la actividad de baja frecuencia, acompañado de una disminución marcada de la potencia en frecuencias altas. La localización de las fuentes de dicha actividad permitiría no solo ayudar al diagnóstico de la EA o del DCL

sino, más importante aún, estimar el riesgo de evolución hacia la demencia.

Los dos mecanismos (no excluyentes) que podrían explicar ese «enlentecimiento» del EEG son la deaferentación cortical y la hipótesis colinérgica. Es bien conocido que la deaferentación corticotálámica y las lesiones de sustancia blanca producen un patrón típico de actividad delta polimórfica (100). Estudios relativamente recientes demostraron que en la EA no solo se producen lesiones de sustancia gris sino también de sustancia blanca (101,102). Además estudios histopatológicos sugieren que existe una pérdida selectiva de neuronas piramidales que pueden producir un síndrome de desconexión corticocortical (103). Holschneider et al. (93), plantearon que este síndrome de desconexión podría explicar, al menos en parte, tanto el incremento de la potencia delta, como la disminución marcada de la potencia en banda beta.

Respecto a la hipótesis colinérgica, estudios clásicos como los de Riekkinen et al. (104,105), detectaron una correlación significativa entre los niveles de acetilcolinesterasa en el líquido cefalorraquídeo y la potencia delta en los

enfermos EA. Este hallazgo se vio ratificado por estudios EEG y MEG en los que una dosis de escopolamina (un antagonista de los receptores colinérgicos muscarínicos) producía cambios significativos en la actividad cerebral espontánea, que básicamente eran una reducción de las potencias alfa y beta unida al aumento de las potencias delta y theta, muy similares a los que se observan en la EA.

El apoyo más definitivo a esta hipótesis de una relación entre disminución de frecuencias altas y déficit colinérgico viene dada por dos estudios de lesiones realizados por el grupo de Holschneider (106,107). En el primer estudio, una serie de ratones de laboratorio sirvieron como modelo animal de la EA y para ello recibieron lesiones selectivas del *nucleus basalis* (la mayor fuente de aferentes colinérgicos ascendentes situado en el prosencéfalo basal). Esta lesión producía un aumento selectivo de la potencia delta y una disminución de la potencia beta.

En un segundo estudio, los animales fueron tratados con una inmunotoxina colinérgica selectiva (107). Esta inmunotoxina producía un aumento de la potencia 1-4 Hz y una

disminución generalizada de la potencia en un amplio espectro de los 20-44 Hz.

Davis et al. (108) indicaron que los valores de la acetilcolinesterasa y de la colinacetiltransferasa no estaban reducidos en los tejidos analizados postmortem de pacientes diagnosticados recientemente de DCL. DeKosky et al. (109), tampoco fueron capaces de encontrar reducción alguna de los niveles de colin-acetiltransferasa en diversas regiones del cerebro de pacientes con DCL. De hecho, parecía que la actividad de esta enzima estaba incrementada en dichos pacientes, lo que fue interpretado como un mecanismo compensatorio que aparecería en los pacientes con DCL antes de evolucionar a EA. Estos artículos suponen un reto para la hipótesis colinérgica aplicada al DCL y a los estadios más iniciales de la EA.

PLANTEAMIENTO E HIPÓTESIS

2. PLANTEAMIENTO

Como se ha indicado anteriormente, la EA es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente y la causa más común de demencia en los ancianos. Diversas líneas de evidencia sugieren que el péptido βA tiene un papel causal en su patogenia, pero los mecanismos subyacentes siguen siendo inciertos. Existen pruebas recientes de que βA puede ser parte de un mecanismo de control de la actividad sináptica. La acumulación patológica de conjuntos de oligómeros βA deprime la transmisión excitatoria a nivel sináptico, pero también provoca patrones aberrantes de actividad, circuitos y descargas neuronales epileptiformes a nivel de red. La disfunción inducida por el βA a interneuronas inhibitorias probablemente aumenta la sincronía entre las células principales excitatorias y contribuye a la desestabilización de las redes neuronales. Estrategias que bloquean estos efectos del βA podrían prevenir el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer.

La detección precoz del EA, antes de que se pueda detectar los síntomas externos, es un gran reto. Es por eso que dentro del planeamiento del problema, proponemos un enfoque, basado en análisis de señales neurofisiológicas que permita detectar patrones específicos de las ondas del cerebro que se relacionan con la EA varios años antes de la aparición de los síntomas clínicos.

Si las neuronas mueren, el cerebro genera señales eléctricas ligeramente diferentes, lo que se reflejará en un patrón diferente de las señales del cerebro. En exámenes del EEG se pueden observar estas diferencias. Se pueden observar a nivel de la corteza temporal o en análisis del espectro de potencia del EEG y en diferentes regiones. Estas diferencias de patrón se podrían utilizar como una pista para encontrar los primeros hallazgos a nivel de la actividad cerebral de la EA.

Se han generado diferentes modelos animales de la EA basados en modificaciones de la APP, de la PS o de la proteína tau. Nuestro trabajo experimental va a utilizar un modelo de ratón transgénico de doble mutación:

B6SJLTg(APP^{SwFILon},PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799Vas/J.

Los ratones transgénicos 5XFAD sobre expresan tanto la mutación APP humana (695), la sueca (K670N, M671L), la de Florida (I716V) y la Londinense (V717I). La expresión de ambos transgenes está regulada por elementos neurales específicos del ratón, como el promotor *Thy1* para conducir la sobreexpresión en el cerebro. Estos ratones transgénicos 5XFAD expresan las principales características de la patología amiloide en la EA y pueden ser modelos útiles de la neurodegeneración intraneuronal β A-42, inducida por la formación de placas de β A.

2.1. HIPOTESIS

2.1.1. Causalidad entre la Enfermedad de Alzheimer y la Epilepsia

Los resultados mostrados anteriormente por otros autores sugieren que la generación de placas β A influyen en la actividad de las neuronas corticales y podrían ser las responsables de los cambios en el EEG que se han observado en los enfermos de EA y posiblemente en la generación de actividad interictal que también se ha observado en el EEG de estos pacientes.

Estos procesos deberían ser similares en un modelo de ratón de la EA. Estos animales modificados también presentan placas de β A por lo que también deberíamos observar cambios en el EEG provocados por la presencia de estas placas. Por tanto, sería esperable que en la medida que se tenga más placas β A se observará una mayor actividad interictal en el registro cerebral de ratones doble transgénicos APP/PS1.

2.1.2. Marcadores Neurofisiológicos de evolución de enfermedad entre EA y DC

Si existe una correlación entre el número de placas de βA y la actividad interictal, se podrían extrapolar estos hallazgos a los pacientes con EA o en el periodo que refieren síntomas de DC; de tal manera que nos permita establecer si existen indicadores neurofisiológicos tempranos (actividad interictal). Estos estudios podrían determinar y hacer una discriminación entre pacientes con deterioro cognitivo que merecen seguimiento porque tienen un riesgo elevado de desarrollar EA y pacientes que solo presentan un DC.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS CONCRETOS

Las hipótesis anteriores se analizarán a partir de los siguientes objetivos concretos:

3.1.1.1. Objetivo 1.

Estudiar los grafoelementos de la actividad del electrocorticograma (ECG) de ratones doble transgénicos APP/PS1 (3, 6 y 9 meses de edad) y en ratones control (wild-type; WT) para determinar la presencia de actividad ictal y/o interictal o cambios en el EEG basal. Se realizará un registro del ECG. Observaremos cuales son los grafoelementos frecuentes en este tipo de modelo de la EA.

3.1.1.2. Objetivo 2.

Establecer si el grado de activación cortical influye en la aparición de actividad ictal y/o interictal en el modelo de EA. Realizaremos experimentos con ratones WT y APP/PS1 a los que se les aplicará fármacos que aumenten la actividad colinérgica y evaluar si esta activación aumenta la actividad ictal y/o interictal en animales WT y en ratones APP/PS1.

3.1.1.3. Objetivo 3.

Determinar si los ratones APP/PS1 tienen una mayor susceptibilidad a presentar descargas epilépticas. Se inyectarán fármacos epileptogénicos que provocan la actividad ictal y se determinará si los ratones doble transgénicos tienen una menor latencia en la descarga epiléptica provocada por estos fármacos que los animales WT.

3.1.1.4. Objetivo 4.

Definir la correlación entre la presencia de placas de A β en la corteza cerebral y la presencia de actividad epileptiforme (ictal o interictal) en los ratones doble transgénicos. Analizaremos si existe una relación causal entre la presencia y/o aumento del número de placas y de la actividad epileptogénica en ratones APP/PS1. Provocaremos la presencia de placas de A β en la corteza cerebral en animales WT, mediante la inyección de una neurotoxina, y determinaremos si la presencia de placas provoca actividad ictal y/o interictal.

3.1.1.5. Objetivo 5.

Estudiar la actividad EEG de personas adultas con patologías de deterioro cognitivo (DC) y demencia tipo Alzheimer y determinar la existencia o no de alteraciones de su actividad basal en el EEG. Se valorarán la presencia de grafoelementos patológicos y patognomónicos de las dos patologías, similares a los que presentan el modelo animal APP/PS1.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. EXPERIMENTOS EN ANIMALES WILD TYPE Y TRANGENICOS APP/PS1

4.1.1. Animales de experimentación

Se estudiaron ratones de tres y nueve meses de edad de ambos sexos que pesaban entre 25-30 g de peso, de la estirpe C57BL6/J (wild type; WT), o APPSWE y APP/PS1 de NIH (Estados Unidos, donación de I. Torres-Aleman, Cajal Institute, CSIC). Los ratones transgénicos son de la cepa C57BL6/J que expresan dos transgenes humanos mutados (APP^{swe} y PSEN1^{dE9}) causantes de enfermedad de Alzheimer familiar bajo control del promotor murino de la proteína priónica.

En estos estudios se utilizó el siguiente número de animales: wild type (n = 15), APPSWE (n = 8) y APP/PS1 (n = 20).

4.1.2. Condiciones del experimento

En las instalaciones del Animalario de la Facultad de Medicina UAM se mantuvieron a los animales en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad ($50 \pm 10\%$), en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y alimentados *ad libitum* con agua y

pienso compuesto comercial esterilizado por irradiación. Los ratones se alojaron en jaulas de plástico transparente, apropiadas para este tipo de animales.

4.1.3. Resolución de normas de trabajo y procedimientos con animales

Todos los experimentos realizados en este estudio se sometieron a la evaluación del Subcomité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid. El mantenimiento, manipulación, anestesia y eutanasia de los animales cumplió en todos sus extremos la normativa española vigente (Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y Ley 32/2007 de 7 de Noviembre para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio) y europea (Directiva 2010/63/CE que modifica la Directiva 86/609/CEE).

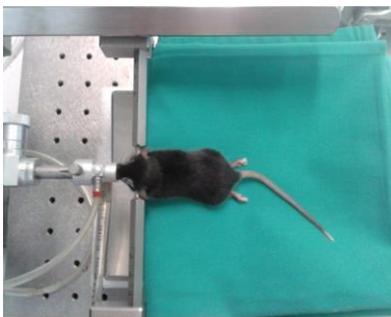
4.1.4. Anestesia

Los animales fueron inicialmente anestesiados con una mezcla de ketamina (75 mg/Kg) y xilacina (10mg/Kg) para su colocación en el aparato estereotáxico. Después de administrada la anestesia vía intraperitoneal se introdujo a los ratones en una cámara de inducción donde se les aplicó 2,5% de Isoflurano en un flujo de oxígeno de 0,4 l/m. Una vez inducidas y a lo largo de la cirugía, se mantuvo la anestesia a 0,5% mediante una máscara apropiada para ratón (Fig. 8).

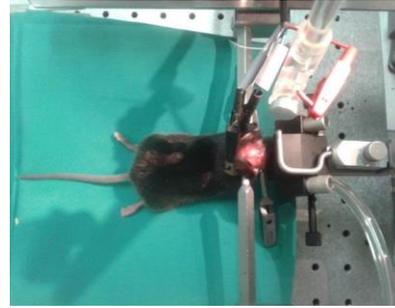
A.



B.



C.



D.



E.

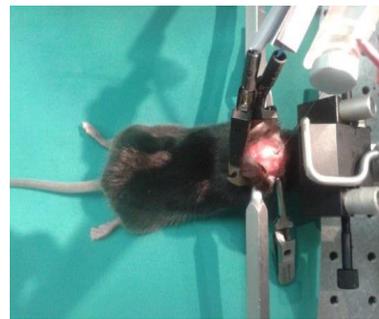


Fig. 8. Preparado experimental A: aparato de anestesia y oxígeno. B: ratón con anestesia inicial intraperitoneal, C: animal colocado en aparato estereotáxico; D: apertura de la piel sobre la calota; E: colocación del macroelectrodo.

4.1.5. Procedimientos quirúrgico y de registro

La cirugía y el registro se realizaron bajo anestesia con isoflurano. Se comenzó con un corte en la piel del cráneo a lo largo de la línea media, posteriormente se realizó una craneotomía (0,5 mm de diámetro) sobre el área somatosensorial primaria (S1, 1 mm caudal al bregma y 2 mm de la línea media), según el Atlas de Paxinos & Franklin (2012) Se colocó un macroelectrodo de tungsteno de 0,5 M Ω sobre las meninges para registrar la actividad eléctrica cortical (ECG), tras lo cual la concentración de isoflurano se redujo a 0,5-1,5%, dependiendo de los requerimientos individuales, para obtener una actividad de ondas lentas estable y en ausencia de reflejos.

La actividad ECG se registró entre el macroelectrodo colocado en S1 y un electrodo de referencia colocado en la musculatura de la cabeza. Esta señal se filtró entre 0,3 y 30 Hz y se amplificó mediante un amplificador P15 Grass. Las señales se digitalizaron mediante un conversor analógico/digital con una frecuencia de muestreo de 100 Hz CED 1401

Plus (Cambridge, RU). Por el proceso de adquisición, entendemos una serie de pasos por los que la señal es muestreada y digitalizada para su almacenamiento en el ordenador. La frecuencia de muestreo nos dice el número de valores por segundo que el conversor analógico-digital va a tomar de nuestra señal original. Para determinar la frecuencia de muestreo (100 Hz) utilizamos el teorema de Shannon-Nyquist que establece que la señal debe muestrearse a una frecuencia al menos el doble que la frecuencia máxima de interés contenida en la señal (en nuestro caso 30 Hz).

Los datos obtenidos de los registros EEG se analizaron utilizando el software Spike 2 (CED, Cambridge, RU). El análisis consistió en el cálculo del espectro de potencia de la actividad cerebral mediante el cálculo de la transformada rápida de Fourier y la detección de los eventos epileptiformes mediante la colocación de un umbral que detectaba estos eventos en cada registro.

Después de finalizar el experimento se utilizó como método de eutanasia un flujo de oxígeno con Isoflurano al 2.5%, y posteriormente se administró una dosis letal de Pentobarbital (50 mg/Kg).

4.1.6. Experimentos con fisostigmina y atropina

Se realizó inicialmente un registro del ECG durante 5 minutos como control en los ratones WT y APP/PS1. Después, se procedió a inyectar 1 mg/kg dosis de fisostigmina (inhibidor de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa) o atropina (bloqueante de los receptores colinérgicos del tipo muscarínico) de forma intraperitoneal y se continuó el registro durante 15 y 30 minutos.

4.1.7. Experimento con pentylenetetrazole

Para evaluar la susceptibilidad de generar una descarga epiléptica en ratones WT y en los ratones APP/PS1, se inyectó pentylenetetrazole (PTZ) a concentraciones de 60 mg/Kg, intraperitonealmente y se midió la latencia en la que aparecieron puntas epilépticas de forma continua. Se ha descrito que esta droga y en esta concentración genera descargas epilépticas en ratones WT sin que el animal presente convulsiones (110).

4.1.8. Experimento con DSP4

En esta oportunidad quisimos evaluar la respuesta de los ratones WT al DSP4 (hidrocloruro de N- (2-cloroetil) -N-etil-2-bromobencilamina). El DSP4 es una neurotoxina selectiva para el sistema noradrenérgico que actúa como un inhibidor irreversible del transportador de noradrenalina. Pero, además, provoca la aparición de placas de β A (111).

Se administra en dos dosis intraperitoneales de 50 mg /kg en los días 1 y 7. Seis meses más tarde se realizó el registro de la actividad ECG durante un periodo de 15 a 30 minutos con iguales criterios de registro que los mencionados con anterioridad.

Finalmente se aplicó el método de eutanasia descrito anteriormente y se perfundieron los animales transcardialmente con paraformaldehído al 4% en 0,1 M buffer fosfato y se continuo con concentraciones crecientes de sacarosa (5%, 10%, and 20%) en el mismo buffer. El cerebro se extrajo y se almacenó en sacarosa al 30% por unos días hasta que el cerebro fue cortado en un microtomo de congelación en planos de 40 μ m de grosor.

Los cortes fueron procesados inmunohistoquímicamente.

4.1.9. Estudio anatómico

Después de finalizar los experimento se utilizó como método de eutanasia un flujo de oxígeno con Isoflurano al 2.5%, y posteriormente se administró una dosis letal de Pentobarbital (50 mg/Kg). Se perfundieron los animales y se extrajeron los cerebros para su posterior estudio anatomo-patológico.

Para el estudio de tinción e identificación de placas de β A en el cerebro de los ratones, se utilizó el anticuerpo (Monoclonal Mouse Anti-Human Beta-Amyloid Clone 6F/3D; Nagoya, Japan), que reconoce el extremo N-terminal de las formas de β A tanto de roedores como de humanos. Se realizaron cortes de 40 μ m que se incubaron con el anticuerpo. Después de la reacción inmunohistoquímica, los cortes se visualizaron con microscopía óptica convencional.

4.2. ANALISIS DE LOS REGISTROS

4.2.1. Criterios de actividad epileptiforme en animales transgénicos:

Se analizaron visualmente los registros de ECG para detectar grafoelementos epilépticos. Se consideró los siguientes patrones de actividad epileptiforme (ictal e interictal) adaptados según *los criterios de Clement C. (112)*, teniendo en cuenta, variables como: Amplitud, Duración, Forma y Patrón de aparición. (Tabla. 1).

<p>Spike: ondas de 20-70 ms de duración con polaridad positiva o negativa y con amplitudes que exceden dos veces la amplitud media del ECG.</p> <p>Sharp wave: onda con una duración de 70- 200 ms y amplitud variable.</p> <p>Spike y complejo de onda (evento epiléptico): punta (spike) seguido de ondas lenta de duración mayor de 200 ms.</p> <p>Polispike: dos o más spikes consecutivas.</p> <p>Polispike y onda lenta: polispike seguido de onda lenta.</p> <p>Crisis electroencefalográfica: un claro cambio del patrón de trazado con la aparición de descargas de spike repetidos o spike y onda lenta con una alta amplitud y una duración de > 5 s.</p>

Tabla 1: Criterios de Clement de los diferentes tipos de actividad epileptogénica.

4.2.2. Análisis del ECG en ratones

Se utilizó el algoritmo rápido de la transformada de Fourier para calcular el

espectro de potencia. La densidad de potencia media se calculó para cuatro bandas de frecuencias diferentes que constituyen el ECG global: δ banda (0,3-4 Hz), θ -banda (4-8 Hz), α -banda (8-12 Hz) y β -banda (12-30 Hz). Las frecuencias más rápidas no se consideraron porque su contribución al ECG en animales anestesiados es prácticamente nula. Cada 5 min se calculó el porcentaje de contribución de cada banda respecto a los niveles en condiciones control. Se consideró el 100%, la suma de las potencias de cada una de las 4 bandas de frecuencias registradas en el ECG.

Todos los datos se muestran como media \pm error estándar. Teniendo en cuenta que los datos no cumplieron los criterios de normalidad, las comparaciones entre dos grupos se analizaron utilizando la prueba estadística de datos pareados Wilcoxon o la prueba de Mann Whitney. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas al nivel del 95% ($p < 0,05$).

4.3. EXPERIMENTOS EN HUMANOS

4.3.1. Estudios realizados en pacientes con DC, EA.

Se estudiaron los EEG de 21 pacientes con diagnóstico de DC (registrados en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid; 11 pacientes), en los Hospitales HM La Coruña (18 pacientes) y de la Universidad Pablo Olavide (18 de ellos con pacientes con EA y más de 6 meses de síntomas de deterioro cognitivo).

Estos estudios se plantearon para responder a la pregunta de si los resultados obtenidos en ratones se podían observar en pacientes con DC y EA, además de si el número de puntas cambiaba en etapas tempranas o tardías de la enfermedad.

4.3.2. Condiciones de los pacientes. Tratado de Helsinky y normas para el estudio con pacientes

Todos los experimentos realizados en pacientes se sometieron a la normativa ética internacional para la experimentación con personas basadas en la Declaración de Helsinki de la AMM.

Los pacientes son elegidos por el Servicio de Neurofisiología Clínica del Hospital Ramón y Cajal; Servicio de Neurología de la Universidad Pablo Olavide y por el

Departamento de Neurofisiología Clínica del Hospital Modelo.

4.3.3. Registros Electroencefalográficos (EEG)

4.3.3.1. Variantes de montaje de electrodos

Los electrodos se colocaron 64 electrodos sobre el cuero cabelludo, según el sistema internacional 10-20. Los electrodos de registro se referenciaron a un electrodo colocado en la mastoides.(Fig. 9)

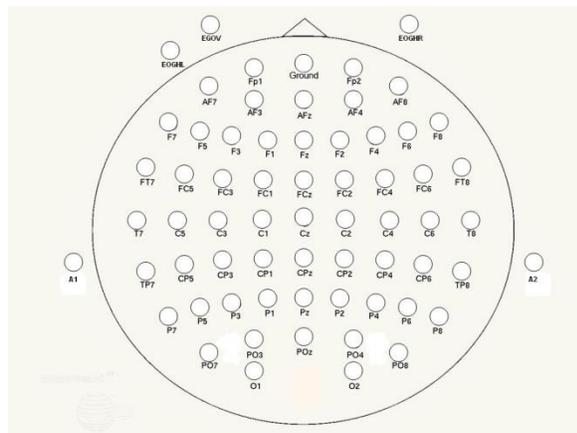


Fig. 9. Montaje de registro de actividad cerebral. Cortesía de la Universidad Pablo Olavide.

4.3.3.2. Instrumentos

Se han realizado y analizado los registros del EEG con equipos de registro

electroencefalográfico tipo XLTEK 16 U, 32 U, Natus medical incorporated.

El registro se ha analizado a partir de derivaciones bipolares longitudinales y transversales y se ha trabajado con una sensibilidad de 1 mm = 7-10 μ V, una banda de paso de 1 - 70 Hz y a una velocidad de 15-30 mm/s.

4.3.3.3. Definición y clasificación de descargas interictal

La Federación Internacional de Sociedades de Electroencefalografía y Neurofisiología Clínica (IFSECN) describe las descargas interictal (IDEs) como una subcategoría de "patrón epileptiforme", definidas a su vez como "ondas distintivas o complejos, que se distinguen de la actividad de fondo y se asemejan a los registrados en una proporción de pacientes que padecen trastornos epilépticos... ". Esta definición deja claro que los criterios deben ser verificados empíricamente. (Tabla. 2)

Las descargas interictal pueden ser divididas morfológicamente en ondas agudas, espigas, complejos de espigas y ondas (también llamados complejos de spike y

ondas lentas) y complejos de onda polispikes (también llamados complejos de múltiples spikes y ondas lentas), como se describió anteriormente. Los IEDs DEFINELo pueden ocurrir aisladamente o en breves estallidos; Las ráfagas más largas que unos segundos representarán las convulsiones electrográficas en lugar de las descargas interictal.

Se utilizan las siguientes definiciones:

Onda aguda - Transitoria, claramente distinguible de la actividad de fondo, con pico puntiagudo y una duración de 70-200 milisegundos (ms).

Spike - Igual que la onda aguda, pero con una duración de 20 a de 70 ms.

Complejo de onda y onda lenta - Patrón consistente en un pico seguido de una onda lenta (clásicamente la onda lenta es de mayor amplitud que la espiga).

Complejo múltiple de espigas y ondas lentas - Igual que complejo de spikes y ondas lentas, pero con 2 o más spikes asociadas con una o más ondas lentas.

Tabla 2: International Federation of Societies for Clinical Neurophysiology. A glossary of terms most commonly used by clinical electroencephalographers.

El área temporal es la localización más común de la generación parcial de convulsiones y de las descargas interictales. El máximo de campo eléctrico en F7/F8

suele indicar la localización temporal anterior, especialmente si T3/T4 (T7/T8 en la nueva terminología) también está implicado significativamente, mientras que los máximos en T3/T4 indican una localización temporal y T5/T6 (P7/P8) localizaciones temporal posterior.

4.3.3.4. Descargas periódicas

Los IEDs repetitivas generalmente indican un mayor riesgo de convulsiones que las descargas esporádicas. Cuando son continuas o casi así, es decir, sin actividad de fondo intermedia, tales patrones constituyen convulsiones electrográficas. Cuando se observa un intervalo más claro entre las, el patrón se denomina periódico y puede constituir una fase de transición entre los eventos interictal e ictal. Esta naturaleza transitoria puede ser confirmada por una clara evolución en convulsiones electrográficas, o por resolución gradual, generalmente durante varios días (113).

Como ya se ha mencionado, las descargas generalizadas y focales aisladas pueden demostrarse que afectan a las tareas

cognitivas sensibles. Las descargas en el lado izquierdo pueden afectar a las funciones verbales, a la derecha, visoespaciales, las descargas posteriores a la función visual (114, 115, 116,117). Este deterioro cognitivo transitorio puede estar más relacionado con la onda lenta que ocurre posteriormente a la descarga, presumiblemente un evento inhibitorio, que con la misma descarga. La evidencia reciente sugiere que los medicamentos que suprimen las descargas interictal pueden mejorar el comportamiento en niños con epilepsia leve. El valproato, la lamotrigina y el levetiracetam probablemente suprimen los picos más que la carbamazepina o la fenitoína; Esto es particularmente cierto para las descargas generalizadas de onda de espiga, que pueden ser agravadas por la carbamazepina y quizás la fenitoína (118, 119, 120, 121, 122, 123).

4.3.3.5. Criterios de actividad paroxística e interictal en pacientes con DC y EA.

Se analizaron visualmente los registros EGG de los pacientes con DC y EA para detectar grafoelementos epileptogénicos. Se consideró los siguientes patrones de

actividad epileptiforme ictal/interictal teniendo en cuenta los criterios de La Federación Internacional de Sociedades de Electroencefalografía y Neurofisiología Clínica (IFSECN). Teniendo en cuenta variables como: Amplitud, Duración, Polaridad y Forma.

El promedio de la frecuencia fue calculado el número de eventos por minuto. Los pacientes con epilepsia pueden presentar en el EEG varias alteraciones que no se correlacionan directamente con la presencia de epilepsia, pero evidencian anomalías funcionales o estructurales. Estos cambios ayudan muy limitadamente al diagnóstico, básicamente sustentando un cambio orgánico. La lentificación del ritmo de base puede indicar la presencia de una encefalopatía, estática o transitoria, que puede estar asociada a la epilepsia o incluso ser indicativo del uso de antiepilépticos; las lentitudes focales continuas polimorfas se asocian a lesiones estructurales mientras que las episódicas y rítmicas, especialmente las temporales, si bien deben considerarse inespecíficas tienen una mejor correlación con epilepsia focal; la presencia de actividad intermitente rítmica delta en el lóbulo temporal que sigue la distribución de las

espigas o puntas (TIRDA, siglas del término inglés) tiene para algunos una alta correlación con la presencia de esclerosis mesial temporal y probablemente es un indicador de la actividad registrada a distancia y no la expresión de una lesión estructural. Las lentitudes delta rítmicas bifrontales (FIRDA) o generalizadas (IRDA), son también inespecíficas. Las asimetrías del ritmo alfa o del ritmo anterior beta, de los husos de sueño o la depresión de voltaje unilateral tienen valor lateralizador pero inespecífico.

Onda theta aguda: puede significar irritabilidad neuronal por epilepsia primaria; en este caso puede ser focal, o generalizada y sincrónica (podrían corresponder a irritación cortical o corticosubcortical respectivamente en algunos casos); puede ser secundaria a traumatismo, trepanación, tóxicos, arteriosclerosis, neoplasia, migraña, psicosis, y un largo etc.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Registros de la actividad ECG en animales WT y APP/PS1.

Se estudió la actividad ECG en la corteza somestésica para determinar la presencia de actividad epileptiforme (ictal-interictal) en ratones WT (controles) y en ratones doble transgénicos AAP/PS1 de acuerdo con los patrones descritos en la sección Materiales y Métodos. Esta consistió en: spikes interictales, descargas sharp wave, polispikes (Fig.10 A).

En ratones WT se observaron de forma esporádica la presencia de “spikes” o “polispikes” que pueden deberse a la lesión provocada por la inserción del electrodo en la corteza cerebral. Los ratones doble transgénico APP/PS1 también mostraron este tipo de actividad pero en un número mayor de animales y con mayor frecuencia que en los controles, y en ningún caso fue asociado a la inserción del electrodo. También se observaron otros patrones de actividad epileptiforme (interictal) que no se registraron en los ratones control como “sharp-waves” o descargas tipo polispikes de hasta 3 segundos de duración (Fig. 10A)

Las puntas o spikes consistieron en cambios rápidos en el ECG de una duración y amplitud que se encuentran dentro de los Criterios de Clement, anteriormente citados en el apartado de Materiales y Métodos.

Se ha observado actividad interictal, descargas agudas de ondas (SWDs) y polyspikes (actividad anormal interictal) en registros espontáneas de ECG de ratones APP / PS1 (Figura 10A). Los ratones APP/PS1 (4 a 6 meses) muestran un número significativamente mayor de actividad interictal ($3,6 \pm 0,8$ eventos/5 min; $n = 15$) que los ratones WT de la misma edad ($0,25 \pm 0,1$ eventos/5 min $n = 14$; $P < 0,001$, ensayo de Mann Whitney, Fig. 10B). El evento más frecuente en ratones APP/PS1 fue la presencia de actividad interictal ($2,0 \pm 0,5$ eventos/5 min, Fig. 10), que consistió en:

- spike de corta duracion (50-150 ms), alta amplitud > 20 mV, frecuencia de $1,8$ spikes/5 min.
- Sharp waves y descargas polispike, en menor frecuencia que los spike de entre 1 y $0,8$ eventos/5 minutos respectivamente.

La actividad interictal tienden a disminuir con la edad (7-9 meses) a $2,0 \pm 0,5$

eventos/5 min (n = 6, P = 0,044, prueba de Mann Whitney, Figura 10B). No observamos estatus epiléptico prolongado en ratones APP / PS1 durante el estudio.

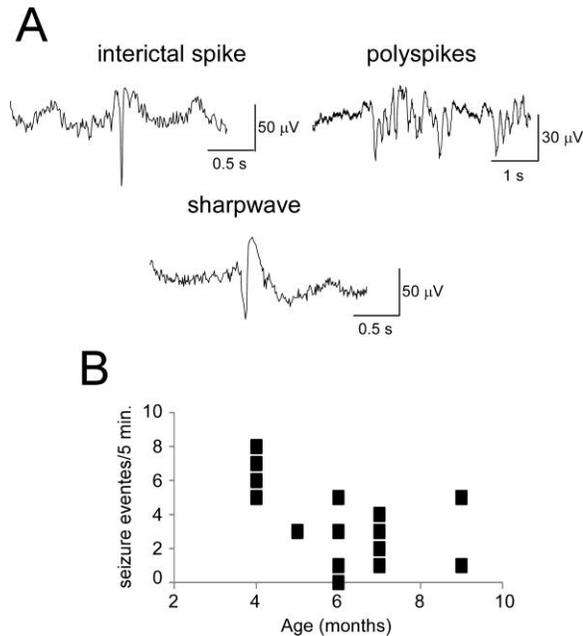


Fig. 10. Características de la actividad interictal registrada en el ECG de ratones APP / PS1. A, representa la actividad espontánea. B, Edad en meses de animales que muestran diferentes tipos de actividad interictal. La actividad interictal de spikes fue la actividad más común en ratones APP/PS1 jóvenes y viejos. Sin embargo, el porcentaje de polyspikes y sharpwaves disminuyó en animales viejos (6-9 meses de edad).

5.2. Actividad de ECG en ratones APP / PS1

Estudiamos la proporción de bandas de frecuencias δ (1-4 Hz), θ (4-8 Hz) y α (8-12 Hz) en el espectro de potencia ECG de ratones WT y AP/PS1.

En condiciones espontáneas, (5 minutos de registro), los ratones WT y APP/PS1 mostraron $92,5 \pm 1,9\%$ y $92,7 \pm 1,4\%$ de las ondas delta, respectivamente (Fig. 11A). El porcentaje de ondas delta fue muy alto que el porcentaje de otras bandas de frecuencia, debido a la anestesia. Además, no encontramos diferencias en las bandas de frecuencia θ y α (Fig. 11B).

No se estudiaron actividades rápidas porque estas fueron ausentes en el ratón bajo anestesia.

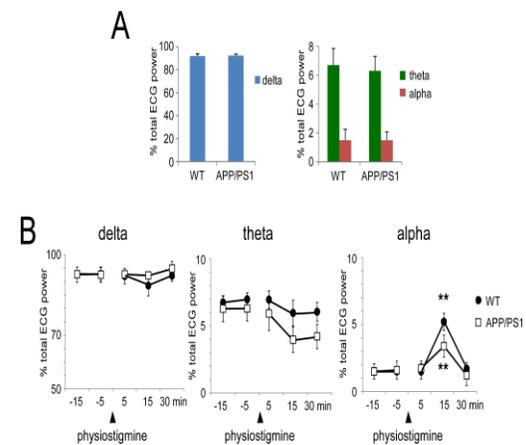


Fig. 11 Características de EEG de ratones APP / PS1 y WT y el efecto de La fisostigmina en el EEG. A, porcentajes de delta, theta y alfa Ondas en el espectro de potencia total. El espectro de potencia se calculó A partir de 5 minutos de actividad espontánea. No se observaron diferencias Entre ambos tipos de animales. B, fisostigmina i.p. Inyección (1 mg / Kg) Aumento de la actividad alfa en el EEG de ratones WT. Sin embargo, el cambio fue Menor en ratones APP / PS1.

Se ha descrito que los pacientes de EA y los modelos animales de esta enfermedad presentan una disminución de la actividad colinérgica que podría ocasionar un aumento de la excitabilidad cortical y la aparición de una actividad epileptiforme. Por este motivo, se determinó los cambios en el ECG y en la frecuencia de la actividad epileptiforme en ratones control y en ratones APP/PS1 tras la inyección intraperitoneal de fisostigmina.

La fisostigmina es un inhibidor reversible de la enzima acetilcolinesterasa que aumenta el nivel de Ach en el cerebro e induce la activación del ECG (124). La inyección de fisostigmina (1 mg/Kg i.p.) aumentó principalmente el porcentaje de actividad alfa en el ECG y reduce la actividad delta y theta con respecto al periodo control (15 minutos antes de la inyección de fisostigmina (Fig. 11B). En ratones WT (4-6 meses, n=8) la actividad alfa aumentó de $0,4 \pm 0,1\%$ en control a $5,2 \pm 0,3\%$ 15 minutos después de la inyección de fisostigmina ($P < 0,01$; $n = 8$), volviendo a los valores de control 30 minutos después de la inyección. La actividad α también aumentó en los ratones APP/PS1 (4-6 meses, n=8) pero en una proporción menor que en los

animales control (de $0,5 \pm 0,06\%$ en control a $3,4 \pm 0,1\%$ 15 minutos después de la inyección de fisostigmina, $P < 0,01$; $n = 8$). La potencia de las frecuencias más rápidas (>12 Hz) en el ECG fue depreciable en estos animales anestesiados por lo que no fueron cuantificadas.

La actividad theta fue reducida en ambos ratones WT y APP/PS1 después de la inyección de fisostigmina, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por tanto, los datos indican que la respuesta colinérgica está disminuida en los ratones doble transgénicos APP/PS1.

Además, la frecuencia de actividad interictal aumentó después de la inyección de fisostigmina (1 mg/kg) en ratones APP/PS1 (de $4,2 \pm 0,8$ a $8,9 \pm 1,0$ eventos/5 min. Fueron medidos 15 minutos después de la inyección de fisostigmina $n = 8$, $P = 0,021$, prueba Wilcoxon de datos pareados, Fig. 12A), mientras que los ratones WT no se alteraron por la fisostigmina (de $0,21 \pm 0,1$ en la condición de control a $0,28 \pm 0,1$ eventos / 5 min, 15 minutos después de la inyección de fisostigmina $n = 8$, $P > 0,05$), prueba Wilcoxon de datos pareados.

Estos datos sugieren que en los animales APP/PS1 puede haber un aumento en la excitabilidad cortical que podría incrementar la probabilidad de actividad anormal interictal.

Si un aumento de la activación cortical produjo un aumento de la frecuencia de actividad interictal, cabría esperar que disminuyera si disminuyera esta activación cortical. Esta disminución fue provocada mediante la inyección i.p. de atropina (1mg/Kg). Diez minutos después de la inyección se observó un aumento de las ondas lentas del ECG, sin embargo la frecuencia de la actividad interictal no cambió en los ratones APP/PS1 (de $2,6 \pm 1,2$ a $2,3 \pm 1,4$ eventos / 5 min $n = 4$, $P = 0,248$, prueba Wilcoxon de datos pareados). Teniendo en cuenta que la atropina bloquea los receptores muscarínicos colinérgicos, que son los principales responsables de la activación cortical, pero no afecta a la frecuencia de la actividad interictal sugiere que esta actividad anómala de los ratones APP/PS1 no es debida al nivel colinérgico sino que es independiente y solamente aumenta cuando se produce un aumento de la excitabilidad cortical, por ejemplo cuando se inyectó fisiostigmina.

5.3. Registros en animales APP

Para determinar si la presencia de actividad del tipo epileptiforme era específica de los ratones APP/PS1 o también aparece en otros modelos de la enfermedad de Alzheimer en ratones transgénicos, hemos registrado 8 ratones con mutación solo en el gen APP. Estos ratones también mostraron este tipo de actividad en el 70% de los animales, con un número significativamente mayor de eventos convulsivos ($2,4 \pm 0,9$ eventos/5 min; $n = 8$) que los ratones WT ($P = 0,025$, ensayo de Mann Whitney). El evento más frecuente en ratones APP fue la presencia de actividad interictal.

5.4. Efecto de la inyección de PTZ

Con el fin de investigar si APP / PS1 son más susceptibles a la generación de descargas epilépticas, administramos PTZ en la dosis de 60 mg / kg (ip) que no provoca convulsiones en los animales anestesiados, pero se ha demostrado que evocan convulsiones en ratones despiertos (125), La latencia de inicio de la primera descarga de actividad epileptiforme inducida por PTZ fue significativamente menor en ratones APP/PS1 ($74,1 \pm 15,7$ s, $n = 8$) que en

ratones WT ($140,0 \pm 6,8$ s, $n = 8$, $P < 0,001$, prueba de Mann Whitney; Fig. 12B).

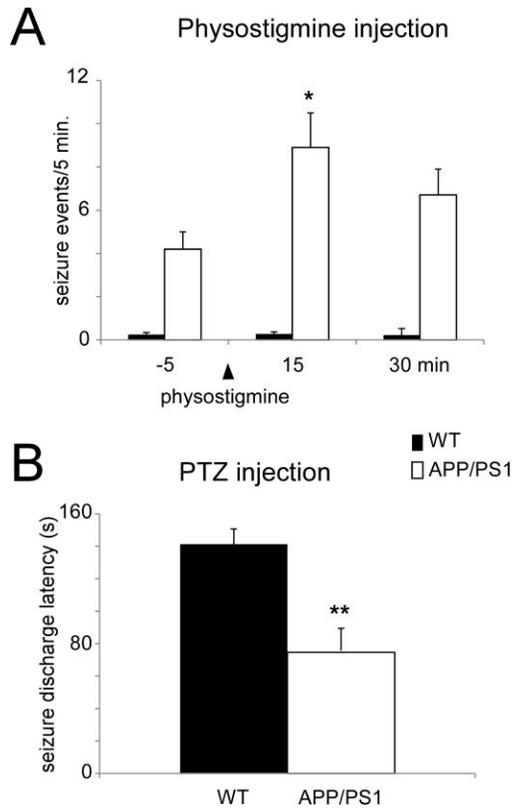


Fig. 12. Los ratones APP / PS1 mostraron una mayor propensión a generar actividad interictal. Un aumento de la actividad EEG mediante inyección de fisostigmina (1 mg / Kg; i.p.) aumentó el número de actividad interictal en ratones APP / PS1 mientras que los animales WT no fueron afectados. B, la latencia para inducir convulsiones por la administración de PTZ (60 mg / kg de peso corporal, i.p.) fue más bajo significativamente en APP / PS1 que en los ratones WT.

Los datos anteriores indican que los ratones APP/PS1 muestran alteraciones en su

excitabilidad cortical, en la respuesta a fisostigmina y también, un aumento en la susceptibilidad a la generación de descargas epilépticas que los animales WT. Sin embargo, estos datos no indican el origen de la actividad anormal interictal. Por ejemplo, una disminución de la excitabilidad cortical no provoca una disminución de la actividad interictal. Una posibilidad es que la formación de la placa cortical cause daño del tejido cerebral que evoca una descarga de actividad ictal o interictal, como ocurre con las epilepsias inducidas por un traumatismo craneal.

5.5. Correlación de la actividad interictal y la presencia de placas A β

Los datos anteriores sugieren que la posible lesión inducida por las placas A β puede evocar la generación de actividad interictal anormal en ratones APP/PS1.

Para probar esta hipótesis hemos correlacionado el número de placas con un diámetro mayor de 20 μ m en la corteza somatosensorial y la frecuencia de actividad interictal en ratones APP/PS1.(Fig.12A)

Como se muestra en la (Fig. 13B), la frecuencia de la actividad interictal fue mayor cuanto mayor era el número de placas A β . El diagrama de dispersión muestra la correlación del número de eventos epileptiformes espontáneos y el número de placa en 15 ratones APP/PS1. La recta indica el mejor ajuste que fue $r^2=0.6688$ ($P=0.0002$).

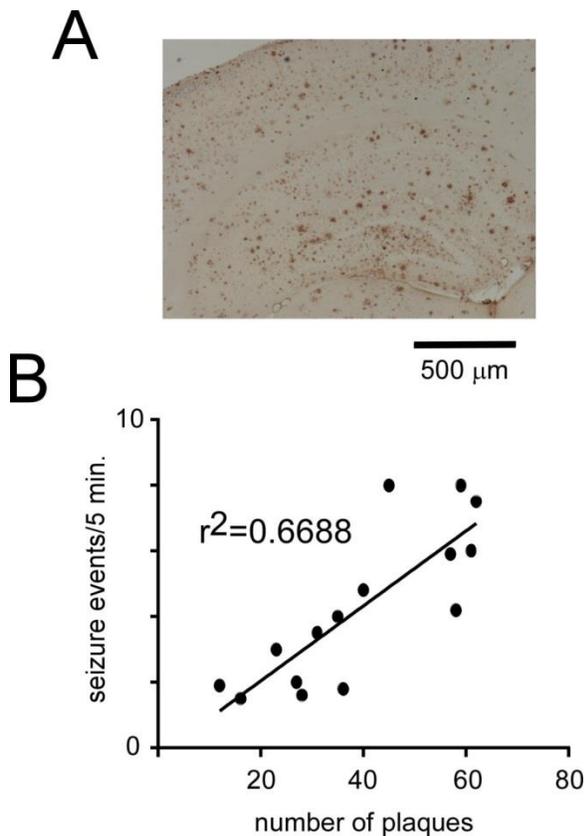


Fig. 13. El número de actividad interictal se correlaciona con el número de placas A β . A, una microfotografía representativa que muestra las placas A β en un ratón APP/PS1 ratón de 9 meses de edad. B, el diagrama de dispersión muestra la correlación entre el número de

espigas/5 min espontáneas y número de placas por milímetro cuadrado en 10 ratones APP / PS1. La recta indica el mejor ajuste ($r^2=0.6688$; $P=0.0002$).

Los datos indican la existencia de una relación de causalidad entre el modelo doble transgénico APP/PS1 con la presencia de la acumulación de placas A β y la presencia de actividad interictal.

5.6. Registros de actividad EEG en ratones wild type tratados con DSP4

Se sabe que alteraciones de la neurotransmisión de norepinefrina provoca la aparición de placas A β en zonas corticales (ver Materiales y Métodos).

Cuando los ratones WT fueron inyectados con salino (control) no mostraron la presencia de placas A β . En cambio, los ratones tratados con DSP4 mostraron un aumento aproximadamente 5 veces en el número promedio de placas A β . La (Fig. 14A) muestra la presencia de estas placas en la corteza de ratones inyectados con DSP4. Este hallazgo fue acompañado por un aumento en la actividad interictal. Los ratones inyectados con DSP4 revelaron una

media de $1,4 \pm 0,4$ eventos/5 min ($n = 12$) mientras que los animales inyectados con solución salina mostraron $0,2 \pm 0,1$ eventos / 5 min ($n = 6$; $P < 0,001$; Fig. 14B). Estos datos sugieren que la presencia de placas en la corteza, tanto en el modelo animal APP/PS1 o generado por DSP4 en ratones WT puede inducir actividad anormal interictal.

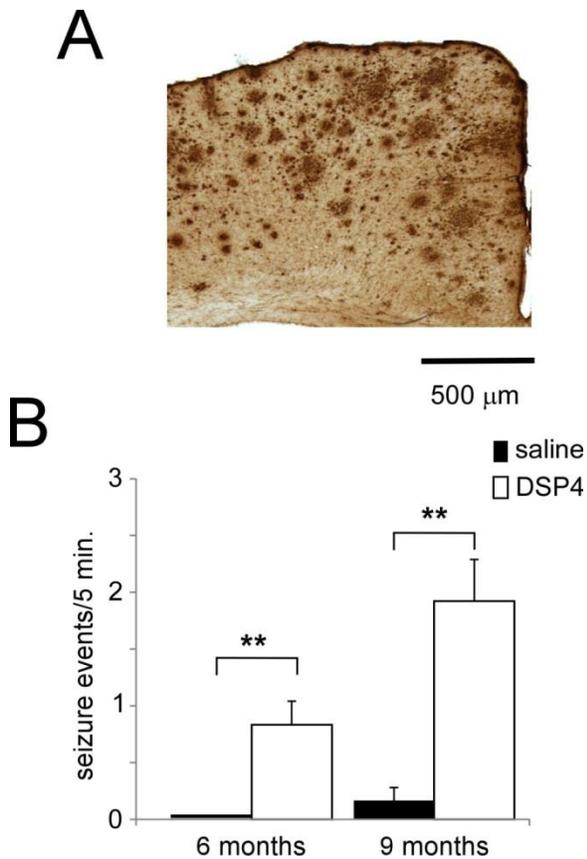


Fig. 14. Placas A β generadas por la inyección DSP4 induce actividad anormal interictal. Actividad en ratones WT. A, una microfotografía representativa que muestra A β . En un ratón WT después de 6 meses de inyección de DSP4

(50 mg / kg). Nota: Las grandes placas de A β inducidas por DSP4. B, frecuencia de puntas interictales en ratones inyectados con DSP4 (barras rojas) y en animales inyectados con solución salina (barras azules). Los datos sugieren que la presencia de placas en la corteza inducida por DSP4, puede provocar actividad anormal interictal.

5.7. Registros EEG de pacientes con EA

Se estudió la actividad EEG en la corteza cerebral para determinar la presencia de actividad epileptiforme (ictal-interictal) en pacientes con EA. El experimento y la elección de los pacientes fueron realizados según los criterios establecidos en el apartado de Métodos.

El grupo formado por las pacientes con DCL y EA estaba formado por pacientes con edades comprendidas entre 53 y 84 años, (media 72.6 ± 1.59 ; Pacientes Univeridad Pablo Olivade Sevilla).

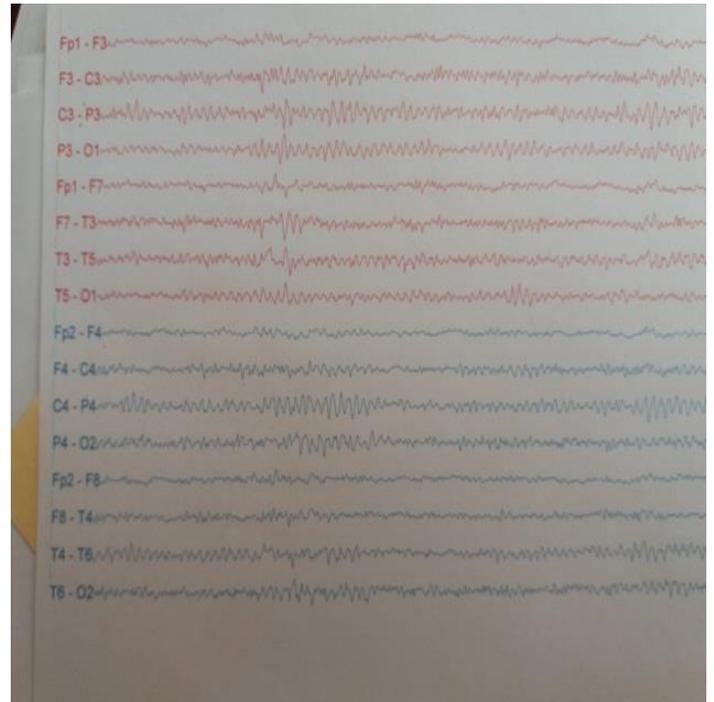
El estudio del registro del EEG se realizó en 19 pacientes, de los cuales en 2 pacientes de EA mostraron anomalías paroxísticas (Fig. 15). El registro se realizó durante aproximadamente 30 minutos y en condiciones de ojos abiertos o cerrados.

Esta actividad anómala consistió en:

a. Brotes de actividad theta aguda en regiones temporales y frontotemporales bilaterales de predominio izquierdo con una amplitud de $30 \mu\text{V}$ y duración de entre 0.2-0.5 s. en una proporción de entre 10-20% del trazado en un periodo de entre 20 y 30 minutos de duración (Fig.15A, B).

b. Actividad ocasional en forma de spikes de predominio temporal, con una amplitud entre $30\text{-}50 \mu\text{V}$ y una duración de 70 ms (ver criterios en Materiales y Métodos) y que correspondería a la corteza cingular anterior. Se encontraron en una proporción de entre el 3-3,5 % del registro de entre 30-60 minutos.

A.



B.

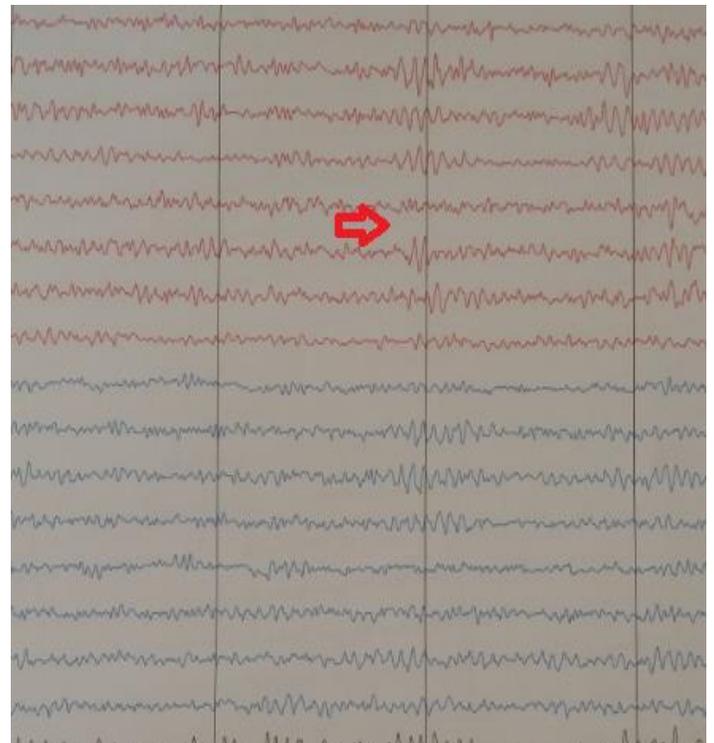


Fig. 15. Registro EEG de paciente con EA. A, B. Actividad tipo theta aguda en región temporal izquierda. C. Actividad theta aguda en paciente con EA.

Estos resultados muestran que se encuentra un mayor actividad paroxística anómala en pacientes con DC y con EA, sin embargo, se necesitaría un mayor número de pacientes con EA para identificar una relación significativa entre estos hallazgo. (Tabla 3).

EEG PACIENTES	PM	PA	PS	PC
AE	0	0	2	0
AP	5	6	6	1

Tabla 3. Actividad epileptiforme y actividad paroxística en pacientes: PM Pacientes en Madrid, PA pacientes Madrid; PS pacientes Sevilla, PC pacientes A Coruña. AE: actividad epileptiforme, AP: actividad paroxística.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. MODELO ANIMAL DOBLE TRANSGENICO, ACTIVIDAD EEG BASAL Y ACTIVIDAD EPILEPTIFORME

Nuestros datos muestran una alta probabilidad de puntas epilépticas, un aumento de la excitabilidad cortical y de la susceptibilidad epiléptica en ratones APP / PS1 en comparación con ratones WT. Además, nuestros datos sugieren que el amiloide depositado en este modelo de ratón puede ser responsable del fenotipo epileptiforme que hemos observado en los ratones APP/ PS1 ya que la frecuencia de las puntas se correlacionó con el número de placas de A β en estos animales y aparecieron en animales control en los que las placas fueron inducidas por DSP4.

Como se indica en la Introducción, la EA se asocia con un riesgo elevado de presentar actividad epileptiforme que puede ser uno de los orígenes de la disfunción cognitiva que presentan estos enfermos. Los trastornos convulsivos y la epilepsia son especialmente pronunciados en las familias con mutaciones de presenilina, en las que casi el 30% de los pacientes presentan esta comorbilidad, llegando a casi el 75% en los casos de variantes particularmente agresivas con inicio antes de los 40 años, (181). Además, se han documentado descargas agudas del tipo epileptiforme de forma espontánea en muchos de los modelos de animales transgénicos para la proteína APP, (182). Aquí, ampliamos significativamente estos hallazgos, mostrando una alta correlación de la actividad interictal con la presencia de placas A β en ratones APP/PS1.

La actividad interictal observada en los ratones APP/PS1 consistió fundamentalmente en puntas aisladas y nunca se observaron descargas duraderas del tipo tónico/clónico. Es decir, no son ratones epilépticos. Sin embargo, cuando la descarga epiléptica fue provocada por la inyección intraperitoneal de PTZ la latencia de aparición de la descarga sostenida fue menor que en los animales control, indicando que este modelo de la EA presenta un aumento de la susceptibilidad a presentar descargas epilépticas. Datos similares fueron observados

anteriormente por otros autores en el que se observó un umbral más bajo para las convulsiones inducidas en ratones transgénicos APP, (183). Estos datos sugieren que estos animales transgénicos pueden mostrar un aumento de la hiperexcitabilidad cortical que a su vez puede generar actividad interictal anormal. El estudio del EEG de los animales APP/PS1 y de los controles no mostraron diferencias que pudieran sostener esta hipótesis. Sin embargo, otros autores si han mostrado alteraciones generales en el patrón de ondas del EEG de ratones transgénicos para la EA, afectando fundamentalmente a las bandas de frecuencia delta, theta y gamma, (184). Esta discrepancia puede ser debida a que nuestros ratones fueron registrados durante la anestesia que provocaba un alto nivel de ondas delta (>80% del espectro de potencia), mientras que los registros publicados anteriormente se realizaron en animales despiertos.

La evidencia experimental sugiere que existe una hiperexcitabilidad neuronal en la EA que puede ser desencadenada por la presencia de A β , el componente principal de las placas amiloides. La aplicación exógena de la proteína A β en el baño de registro in vitro aumenta la actividad de las neuronas excitadoras, (185). Otros autores han indicado que es la sobreexpresión de la proteína APP la que provoca el aumento de excitabilidad neuronal y no las placas de A β porque no encontraron una relación entre la concentración de A β y la presencia de hiperexcitabilidad (186). En consecuencia, los datos han apuntado a A β y/o la proteína APP como el vínculo que conecta la EA con la hiperexcitabilidad de los ratones APP/PS1 y la presencia de descargas del tipo epiléptico. De acuerdo con estos resultados, los pacientes con duplicación del gen APP tendrían un mayor riesgo de presentar epilepsia. Esto es exactamente lo que ocurre en pacientes con síndrome de Down que presentan demencia, (187). Además, estos datos sugieren que la presencia un mayor riesgo de epilepsia puede ir asociado a la demencia, como nos referiremos más tarde.

Las concentraciones de diferentes neurotransmisores se han medido en muestras del cerebro de pacientes con EA y sujetos control de la misma edad, usando técnicas de HPLC. Se observaron niveles significativamente más bajos de los neurotransmisores GABA y glutamato en la corteza temporal de pacientes con EA, lo que indica una función sináptica deficiente en

pacientes con EA, (188). datos indican que la hiperexcitabilidad de los enfermos de EA puede ser debida a una disminución de la transmisión inhibitoria GABAérgica. Se observó niveles disminuidos de GABA en el LCR de pacientes con EA, (189) y alteración en los receptores de GABAA postsinápticos en estos pacientes. El estudio de inmunohistoquímica indicó que las subunidades $\alpha 1$ y $\gamma 2$ del receptor de GABAA postsináptico estaban aumentadas en sujetos de EA, (190). Un estudio de inmunocitoquímica mostró terminales periféricas GABAérgicas disminuidas en secciones cerebrales de pacientes con EA y en ratones transgénicos APP/PS1, especialmente en neuronas corticales adyacentes a placas $A\beta$, implicando la disminución de la transmisión GABAérgica en la EA, (191). Estos resultados están de acuerdo con nuestros datos que revelaron un aumento de la susceptibilidad a inducir epilepsia. El hecho de que la disminución de las terminaciones GABAérgicas se produce cerca de las placas $A\beta$ también coincide con nuestros hallazgos de que el número de placas de $A\beta$ correlaciona con el número de actividad interictal y que la inducción de placas amiloides con DSP4 también induce actividad interictales. Por lo tanto, el sistema GABAérgico podría verse afectado por la presencia de estas placas, o de la proteína APP y podría provocar la actividad anormal interictal.

Se conoce que existe una disminución de las aferencias colinérgicas a la corteza cerebral en pacientes con EA, que producen un deterioro muy importante de la persona que lo sufre, principalmente en los procesos de memoria y aprendizaje. En modelos animales, los ratones doble transgénicos APP/PS1 muestran una disminución de la densidad de los receptores colinérgico del tipo muscarínico y una disfunción del acoplamiento receptor muscarínico-proteína G. Nuestros datos están de acuerdo con esta disfunción del sistema colinérgico en los ratones APP/PS1 ya que la respuesta en el EEG cuando se inyectó fisostigmina estaba reducida respecto a los animales controles. El aumento de la excitabilidad cortical provocado por la fisostigmina aunque reducida si fue suficiente para provocar un aumento del número de eventos epileptiformes, indicando que la hiperexcitabilidad y la presencia de esta actividad estaban correlacionadas. Sin embargo, nuestros datos también indican que el origen de la actividad interictal probablemente no sea colinérgico ya que la aplicación de atropina no disminuyó actividad interictal anormal.

Se sabe que la deficiencia de los niveles de noradrenalina en el cerebro provoca la aparición de placas $A\beta$ en aquellos sitios donde también se acumulan en la EA, (192). Se utilizó la neurotoxina DSP4 que selectivamente produce lesiones en las neuronas noradrenérgicas del LC. Los ratones WT tratados con DSP4 mostraron un aumento en el número de placas de $A\beta$ después de seis meses del tratamiento. El aumento en el número de placas de $A\beta$ se asoció con un aumento en el número de actividad interictal anormal. La hipótesis actualmente aceptada de la patología de EA afecta anormalmente en el metabolismo de $A\beta$ en el depósito de placas que conduce a la muerte neuronal y a la demencia. Los cerebros EA típicamente se caracterizan por la presencia de placas $A\beta$, que pueden inducir actividad anormal del EEG. Nuestros resultados podrían explicar por qué los pacientes con EA tienen un mayor riesgo de desarrollar convulsiones y epilepsia (193).

Sin embargo, existe muy poca evidencia sobre la presencia de anomalías epileptiformes en los pacientes de la EA, y mucho menos su valor pronóstico. El diagnóstico de convulsiones en pacientes con EA no siempre es fácil porque la manifestación de convulsiones parciales puede ser difícil de reconocer y distinguir de otros comportamientos comunes en estos pacientes. Esto puede conducir a la subestimación de la frecuencia real de convulsiones en la EA. Además, nuestros datos dicen que no son verdaderas descargas de puntas epilépticas si no puntas aisladas que puede ser que no tengan una repercusión en el comportamiento del individuo. Nuestros hallazgos sugieren que un estudio cuidadoso del EEG podría ayudar a diagnosticar esta patología. La confirmación de una relación causal entre la presencia de $A\beta$, la disminución de las proyecciones colinérgicas y una actividad electroencefalográfica aberrante en la EA, aportaría importantes conocimientos sobre esta enfermedad y demostrar que la actividad electroencefalográfica aberrante favorece y evoluciona hacia un deterioro cognitivo e incluso EA podría abrir nuevas vías terapéuticas.

6.2. ACTIVIDAD ELECTROENCEFALOGRAFICA EN PACIENTES CON EA Y DCL

Ya hemos visto que las variaciones típicas observadas en el espectro de los enfermos de EA y de los pacientes con DCL tienen en común el aumento de la actividad de baja frecuencia,

acompañado de una disminución marcada de la potencia en frecuencias altas. La localización de las fuentes de dicha actividad podría no solo ayudar al diagnóstico de estados iniciales de la EA o del DCL sino, más importante aún, estimar el riesgo de evolución hacia la demencia.

En la Introducción se indica que uno de los aspectos más relevantes de las técnicas neurofisiológicas, es que las variaciones en el espectro estaban relacionadas con factores fisiológicos claves, relacionados con la demencia.

Los dos mecanismos (no excluyentes) que podrían explicar ese «enlentecimiento» del espectro son la deaferentación y la hipótesis colinérgica. Es bien conocido que la deaferentación corticotalámica y las lesiones de sustancia blanca producen un patrón típico de actividad delta polimórfica (134). Holschneider et al. (116) plantearon que ese síndrome de desconexión podría explicar, al menos en parte, tanto el incremento de la potencia delta, como la marcada disminución de la potencia en banda beta.

La hipótesis colinérgica es una perspectiva complementaria, y tal vez más robusta, para la explicación de las variaciones espectrales. El apoyo más definitivo a esta hipótesis de una relación entre disminución de frecuencias altas y déficit colinérgico viene dada por dos estudios lesionales realizados por el grupo de Holschneider (194,195). Nuestros resultados en ratones APP/PS1 apoyarían esta hipótesis ya que se demuestra que la respuesta a la inyección de fisostigmina está disminuida.

Los pacientes con DCL suelen obtener valores intermedios entre los enfermos EA y los ancianos sanos en una amplia gama de marcadores, uno podría esperar que el enlentecimiento «intermedio» del espectro en el DCL estuviera asociado a un déficit colinérgico también «intermedio». Sin embargo, no existen datos que lo confirmen claramente esta hipótesis. Davis et al. (165) informaron de que los valores de la acetilcolinesterasa y de la colin-acetiltransferasa no estaban reducidos en los tejidos analizados postmortem de pacientes diagnosticados recientemente de DCL. De Kosky et al (166) tampoco fueron capaces de encontrar reducción alguna de los niveles de colin-acetiltransferasa en diversas regiones del cerebro de pacientes con DCL.

De hecho, parecía que la actividad de esta enzima estaba incrementada en dichos pacientes, lo que fue interpretado como un mecanismo compensatorio que aparecería en los pacientes con DCL antes de evolucionar a EA. Estos trabajos suponen un reto para la hipótesis colinérgica aplicada al DCL y a los estadios más iniciales de la EA.

Tal vez estos hallazgos aparentemente contradictorios puedan deberse a que el déficit colinérgico es condición necesaria, pero no suficiente para producir las alteraciones del espectro que hemos descrito y que por otra parte muestran una correlación estable y significativa con el declive cognitivo y funcional de los pacientes. Probablemente, como propuso en su momento Dringenberg (144), la explicación de estas alteraciones se deba a un proceso neurodegenerativo más amplio que sin duda afecta a varios sistemas de neurotransmisión y neuromodulación como el noradrenérgico, el glutamatérgico, etc.

En los estudios realizados en el Laboratorio del Profesor Cantero, hemos podido observar que en dos casos de 19 existen puntas aisladas similares a los registros en ratones. Esta actividad se centró en áreas muy concretas del cerebro, principalmente de predominio temporal. Sin embargo, no podemos estar seguros que no sea una actividad irrelevante ya que, lógicamente, no pudimos aumentar la excitabilidad cortical con fármacos que pudiera aumentar la frecuencia de estas puntas para estar seguro que es una actividad anormal en estos pacientes.

Sin embargo, todos los registros estudiados en pacientes con EA mostraron una actividad paroxística que consistía en brotes de actividad theta que no son comunes en el EEG, sugiriendo que estos pacientes pueden presentar más alteraciones en el EEG pero que debido a su baja frecuencia de aparición no se han correlacionado con la enfermedad. Los brotes de actividad theta no fueron observados en los registros realizados en ratones APP/PS1 o APP. Esto puede ser debido a que estos animales fueron registrados con isofluorano que provoca un aumento muy considerable de las ondas delta, y que podrían estar enmascarando los cambios en la banda theta.

Nuestro estudio no ha podido concluir más datos debido a las limitaciones que hemos encontrado en el tamaño de la muestra. Es difícil encontrar registros de estos pacientes sin que tengan otras patologías asociadas, generalmente del tipo circulatorio que podrían ocasionar cambios en el EEG, además que en muchos de los casos los pacientes se deterioran, o consideran colaborar en determinadas ocasiones, por motivos personales y familiares, lo que imposibilita hacer un seguimiento especialmente cuando aún no hay diagnóstico de EA. Probablemente necesitaríamos realizar los mismos estudios en una población mayor con menor variabilidad y con un seguimiento y determinaciones continuas de este tipo de actividad.

En pacientes con la EA se habla que existe una incidencia aumentada de presentación de crisis pero nunca se ha establecido su relación causal, por lo que tampoco se ha determinado la presencia de puntas epilépticas en registros de EEG ya que no es de uso rutinario en estos pacientes. El registro de la actividad EEG es una técnica no invasiva de bajo costo que podría realizarse en estos enfermos. El registro del EEG podría determinar si en verdad existe esa relación entre el deterioro cognitivo y actividad ictal o epilepsia. Se sabe que en enfermos epilépticos, generalmente niños, existe un deterioro del nivel intelectual que está en relación con la presencia de actividad ictal e interictal (126). Es posible que en los enfermos de EA pudiera existir una relación entre el deterioro del nivel cognitivo secundario a la presencia y aumento de estas descargas aberrantes (interictales) y, por tanto, una opción de terapéutica pudiera ser el uso de fármacos que controlen el origen de actividad ictal desde sus inicios. La presencia de estas puntas podría provocar daños en la corteza cerebral que podrían ocasionar el deterioro cognitivo característico de estos pacientes. Sería muy fácil poder tratar a estos enfermos con fármacos utilizados en el tratamiento de la epilepsia que disminuyeran esta actividad subclínica pero que contribuiría al deterioro cognitivo.

Nuestros resultados muestran que las descargas interictales aparecen en estadios tempranos en el modelo del ratón transgénico APP/PS1 de la EA. También muestran que estas descargas disminuyen con la edad del ratón, probablemente porque el deterioro cortical que produce el desarrollo de la enfermedad en este modelo animal disminuye la excitabilidad cortical y por tanto la frecuencia de aparición de su aparición. Este puede ser uno de los motivos por los que

no observamos puntas epilépticas en los enfermos estudiados con la EA ya que su edad fue avanzada. En cambio, esto es para nosotros muy importante porque nos trasmite la idea de progresión entre un estadio y otro, en donde si se lograra identificar este tipo de actividad en estadios tempranos en pacientes con leves alteraciones de memoria o con factores de riesgo para hacer una demencia, podría permitir una intervención temprana para evitar la devastadora pérdida de memoria y mediante un seguimiento y análisis de la actividad tipo epiléptico, utilizarla como marcador Neurofisiológico, y ayudar a los pacientes a hacer un seguimiento donde no se les somete a diferentes y dispendiosos exámenes que para ellos en esta situación alteran su calidad de vida y no resuelven su situación.

6.3. PERSPECTIVA DEL FUTURO

Teniendo en cuenta la nula invasividad de estos procedimientos y el alto rendimiento en su poder de discriminación, se puede concluir que son medidas que pueden complementar a otros procedimientos que benefician el proceso diagnóstico de la demencia. Su versatilidad y su capacidad para abordar diferentes dimensiones de análisis de la actividad cerebral (espacio-tiempo-frecuencia-conectividad) les confiere una enorme potencialidad en la evaluación del deterioro cognitivo.

Consideramos que la relación entre la actividad tipo spike en estos pacientes puede ser una puerta a estudios más específicos de la actividad neuronal donde se continúen analizando marcadores neurofisiológicos que ayuden al diagnóstico temprano y a evolución a EA. La respuesta de la neurona a diferentes tipos de alteraciones en el funcionamiento de la dinámica cerebral, del circuito y de la vía, puede llegar a aportar los hallazgos que necesitamos para poder identificar tempranamente a los pacientes que harán una EA y aunque no se puede cambiar la genética o la predisposición hacer diferentes trastornos en las vías del metabolismo, que afectan y favorecen la EA, si se puede ayudar a mantener la integridad funcional de la neurona y por lo tanto del circuito, lo que se traduciría en un mantenimiento y retraso de la

pérdida de memoria. Aunque se ha estudiado ampliamente con medicamentos como mantener y mejorar la memoria en estos pacientes, lo cierto es que aún no existe ningún tratamiento efectivo para esta afectación.

Es necesario, que en un futuro inmediato se realicen estudios multicéntricos para abordar los criterios de medicina basada en la evidencia y así aportar las pruebas necesarias para corroborar la posible aplicación clínica de estos procedimientos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios que se han realizado durante la realización de esta Tesis Doctoral, tanto en modelos animales de EA como en registros del EEG en estos pacientes, nos permiten concluir los siguientes puntos:

- 1) Los ratones APP/PS1, modelo de la EA, presentan una actividad epileptiforme anómala que también fue observada en otro modelo de ratón APP, pero no en ratones wild type. En cambio, su actividad de EEG basal no estaba alterada.
- 2) La respuesta a la activación colinérgica está disminuida en los ratones doble transgénicos APP/PS1. Un aumento del nivel de Ach provoca un aumento de la actividad epileptiforme anómala pero el nivel de Ach no es fundamental en la generación de la actividad epileptiforme encontrada en estos animales ya que su disminución con atropina no disminuye la frecuencia de la actividad epileptiforme.
- 3) Los ratones APP/PS1 tienen mayor susceptibilidad a la descarga epiléptica cuando se les induce por la inyección de PTZ que los ratones control.
- 4) La formación de placas de A β se correlaciona con la aparición de actividad epileptiforme que se traduce en términos neurofisiológicos en la aparición de actividad interictal. Sugerimos que la formación de placas A β produce un deterioro del equilibrio excitación-inhibición de la neurona, favoreciendo el inicio de actividad interictal.
- 5) Pudimos observar que se encuentra actividad paroxística en pacientes con EA, lo que se puede extrapolar a los estudios realizados en animales; esto sugiere la posibilidad de un diagnóstico de estos pacientes mediante el registro del EEG y estudiar la evolución de la EA.

6) La actividad paroxística consistió en una actividad ocasional en forma de spikes de predominio temporal, observada en una proporción pequeña de casos, y en brotes de actividad theta aguda en regiones temporales y frontotemporales bilaterales de predominio izquierdo, en todos los caos. Estos datos tienen que ser corroborados en una población mayor de casos.

Considerados en conjunto todos los resultados, los datos que la EEG del modelo animal de la EA, y probablemente en pacientes con esta enfermedad, presenta anomalías que podrían deberse a la acumulación de placas de APP y/o A β . Determinar esta actividad anómala sería muy útil en el diagnóstico de estos enfermos. La confirmación de una relación entre la actividad neuronal aberrante inducida por A β y el declive cognitivo en humanos con la EA proporcionaría importantes conocimientos sobre la patogénesis de la EA y podría abrir nuevas vías terapéuticas basadas.

REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

1. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 60: 1119–1122, 2003.
2. Citron M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5: 677–685, 2004.
3. Faber-Langendoen K, Morris JC, Knesevich JW, LaBarge E, Miller JP, Berg L. Aphasia in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 23: 365–370, 1988.
4. Joana A. Loureiroa, Bárbara Gomesa. Cellular uptake of PLGA nanoparticles targeted with anti-amyloid and anti-transferrin receptor antibodies for Alzheimer's disease treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 145: 8–13, 2016.
5. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1131–1135, 1984.
6. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor *Nature* 325: 733–736, 1987.
7. Divry P, Florkin M. Sur les propriétés optiques de l'amaloïde. On the optical properties of amyloid. *C R Soc Biol* 97: 1808–1810, 1927.
8. Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Ihara Y. A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer-type dementia demonstrated by β protein immunostaining. *Acta Neuropathol (Berl)* 76: 541–549, 1988.

9. Dickson TC, Vickers JC. The morphological phenotype of β -amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 105: 99–107, 2001.
10. Hsiao K. Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Exp Gerontol* 33: 883-889, 1998.
11. Holcomb L, Gordon MN. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4:97-100, 1998.
12. Hanneke de Waal. Functional brain network organization in Alzheimer's disease. *Alzheimer's y dementia The Journal of Alzheimer Association* 9: 4-670, 2013.
13. Joseph L. Price, DPhil; Andy I. Ko, BA; Marcus J. Wade. Neuron Number in the Entorhinal Cortex and CA1 in Preclinical Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 58:1395-1402, 2001.
14. Lyketsos CG, Steinberg M, Tschanz JT. Mental and behavioural disturbances in dementia: Findings from the Cache County study on memory in aging. *Am J Psychiatr* 157:708-714, 2000.
15. Swearer JM, Drachman DA, O'Donnell BF, Mitchell AL. Troublesome and disruptive behaviors in dementia. Relationships to diagnosis and disease severity. *J Am Geriatr Soc* 36: 784–790, 1988.
16. Boada M, Peña-Casanova J, Bermejo F. Coste de los recursos sanitarios de los pacientes en régimen ambulatorio diagnosticados de enfermedad d Alzheimer en España. *Med Clin* 113:690-695, 1999.
17. Flórez JA, Flórez I, Rodríguez J. Familia y enfermedad de Alzheimer: nuevos horizontes de convivencia. *Med Integral* 41: 178-182, 2003.
18. Llibre JJ, Guerra MA. Enfermedad de Alzheimer. Situación actual y estrategias futuras. *Rev Cub Med* 38: 134-14, 1999.

19. Amaducci L. Impact of new therapies on Alzheimer's disease. Management abstract book. 13th International Conference of Alzheimer's Diseases International. Helsinki, 1997.
20. Hsiao K. Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Exp Gerontol* 33:883-889, 1998.
21. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353–356, 2002.
22. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523–527, 1995.
23. Quon D, Wang Y, Catalano R, Scardina JM, Murakami K, Cordell B. Formation of β -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature* 352: 239–241, 1991.
24. Higgins LS, Holtzman DM, Rabin J, Mobley WC, Cordell B. Transgenic mouse brain histopathology resembles early Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 35: 598–607, 1994.
25. Masliah E, Sisk A, Mallory M, Mucke L, Schenk D, Games D. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16: 5795–5811, 1996.
26. Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, et al. A β deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 17: 7053–7059, 1997.
27. Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav Genet* 29: 177–185, 1999.
28. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99–102, 1996.

29. Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, et al. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2: 271–276, 1999.
30. Stern EA, Bacskai BJ, Hickey GA, Attenello FJ, Lombardo JA, Hyman BT. Cortical synaptic integration in vivo is disrupted by amyloid- β plaques. *J Neurosci* 24: 4535–4540, 2004.
31. Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. APPSw transgenic mice develop age-related A β deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 965–973, 1997.
32. Lanz TA, Carter DB, Merchant KM. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol Dis* 13: 246–253, 2003.
33. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13287–13292, 1997.
34. Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci* 17: 388–396, 2003.
35. Lalonde R, Dumont M, Staufenbiel M, Sturchler-Pierrat C, Strazielle C. Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res* 956: 36–44, 2002.
36. Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19: 939–945, 1997.
37. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17: 1005–1013, 1996.

38. Dudal S, Krzywkowski P, Paquette J, Morissette C, Lacombe D, Tremblay P, et al. Inflammation occurs early during the A β deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiol Aging* 25: 861–871, 2004.
39. Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276: 21562–21570, 2001.
40. St George-Hyslop PH. Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 924: 1–7, 2000.
41. Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4: 97–100, 1998.
42. Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89: 629–639, 1997.
43. Flood DG, Lin YG, Lang DM, Trusko SP, Hirsch JD, Savage MJ, Scott RW, Howland DS A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular Abeta deposition. *Neurobiol Aging* 30:1078-1090, 2009.
44. Echeverria V, Ducatenzeiler A, Alhonen L, Janne J, Grant SM, Wandosell F, et al. Rat transgenic models with a phenotype of intracellular A β accumulation in hippocampus and cortex. *J Alzheimers Dis* 6: 209–219, 2004.
45. Lopez EM, Bell KF, Ribeiro-Da-Silva A, Cuellar AC. Early changes in neurons of the hippocampus and neocortex in transgenic rats expressing intracellular human a- β . *J Alzheimers Dis* 6: 421–431, 2004.
46. Machová E, Dolezal V. Importance and prospects for design of selective muscarinic agonists. *Physiol Res* 57 Suppl 3:39-47, 2008.

47. Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278: 412–419, 1997.
48. Bussiere T, Giannakopoulos P, Bouras C, Perl DP, Morrison JH, Hof PR. Progressive degeneration of nonphosphorylated neurofilament protein-enriched pyramidal neurons predicts cognitive impairment in Alzheimer's disease: stereologic analysis of prefrontal cortex area 9. *J Comp Neurol* 463: 281–302, 2003.
49. Squire LR, Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science* 253: 1380–1386, 1991.
50. Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41: 17–24, 1997.
51. West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344: 769–772, 1994.
52. Spires TL, Hyman BT. Neuronal structure is altered by amyloid plaques. *Rev Neurosci* 15: 267–278, 2004.
53. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30: 572–580, 1991.
54. Petersen RC, Stevens JC, Ganguli M, Tangalos EG, Cummings JC, DeKosky ST. Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 56: 1133-42, 2001.
55. Gómez N, Bonnin BM, Gómez MT, Yáñez B, González AL. Caracterización clínica de pacientes con deterioro cognitivo. *Rev Cubana Med* 42: 12-7, 2003.

56. Portet F, Ousset PJ, Visser PJ, Frisoni GB, Nobili F, Scheltens P, et al. MCI Working Group of the European Consortium on Alzheimer's Disease (EADC). Mild cognitive impairment (MCI) in medical practice: a critical review of the concept and new diagnostic procedure. Report of the MCI Working Group of the European Consortium on Alzheimer's Disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 714-8, 2006.
57. Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 9: 208-45, 2013.
58. Cloyd J, Hauser W, Towne A, Ramsay R, Mattson 91 Crisis Epilépticas En La Demencia De La Enfermedad De Alzheimer. *Rev Neuropsiquiatr* 78, 2015.
59. Romanelli MF, Morris JC, Ashkin K, Coben LA. Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures. *Arch Neurol* 47:847-50, 1990.
60. Chin J, Scharfman HE. Shared cognitive and behavioral impairments in epilepsy and Alzheimer's disease and potential underlying mechanisms. *Epilepsy Behav* EB 26: 343-51, 2013.
61. Scharfman HE. "Untangling" Alzheimer's disease and epilepsy. *Epilepsy Curr Am Epilepsy Soc* 12:178-83, 2012.
62. García-Cabrero AM, Guerrero-López R, Giráldez BG, Llorens-Martín M, Avila J, Serratosa JM, et al. Hyperexcitability and epileptic seizures in a model of frontotemporal dementia. *Neurobiol Dis* 58:200-8, 2013.
63. Hommet C, Mondon K, Camus V, De Toffol B, Constans T. Epilepsy and dementia in the elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord* 25:293-300, 2008.
64. Vessel KA, Beagle AJ, Rabinovici GD, Shu H, Lee SE, Naasan G, et al. Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 70: 1158-66, 2013.
65. Born HA. Seizures in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 286:251-63, 2015.
66. Rao SC, Dove G, Cascino GD, Petersen RC. Recurrent seizures in patients with dementia: frequency, seizure types, and treatment outcome. *Epilepsy Behav* EB 14:118-20, 2009.

67. Hesdorffer DC, Hauser WA, Annegers JF, Kokmen E, Rocca WA. Dementia and adult-onset unprovoked seizures. *Neurology* 46:727–30, 1996.
68. Mendez MF, Catanzaro P, Doss RC, ARguello R, Frey WH 2nd. Seizures in Alzheimer’s disease: clinicopathologic study. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7:230–3, 1994.
69. Larner AJ. Presenilin-1 mutation Alzheimer’s disease: a genetic epilepsy syndrome? *Epilepsy Behav* 21:20–2, 2011.
70. Jayadev S, Leverenz JB, Steinbart E, Stahl J, Klunk W, Yu C-E, et al. Alzheimer’s disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain J Neurol* 133:1143–54, 2010.
71. Friedman D, Honig LS, Scarmeas N. Seizures and epilepsy in Alzheimer’s disease. *CNS Neurosci Ther* 18:285–94, 2012.
72. Menéndez M. Down syndrome, Alzheimer’s disease and seizures. *Brain Dev* 27:246–52, 2005.
73. Palop JJ, Mucke L. Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 66:435–40, 2009.
74. Pandis D, Scarmeas N. Seizures in Alzheimer disease: clinical and epidemiological data. *Epilepsy Curr Am Epilepsy Soc* 12:184-7, 2012.
75. Amatniek JC, Hauser WA, DelCastillo-Castaneda C, Jacobs DM, Marder K, Bell K, et al. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer’s disease. *Epilepsia* 47:867–72, 2006.
76. Høgh P, Smith SJ, Scahill RI, Chan D, Harvey RJ, Fox NC, et al. Epilepsy presenting as AD: neuroimaging, electroclinical features, and response to treatment. *Neurology* 58:298–301, 2002.
77. Lozsadi DA, Larner AJ. Prevalence and causes of seizures at the time of diagnosis of probable Alzheimer’s disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22:121–4, 2006.

78. Noebels J. A perfect storm: Converging paths of epilepsy and Alzheimer's dementia intersect in the hippocampal formation. *Epilepsia* 52:39–46, 2011.
79. Leonard AS, McNamara JO. Does epileptiform activity contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease? *Neuron* 55:677–8, 2007.
80. Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55:697–711, 2007.
81. Costa D Dozzi SM. Epilepsy in patients with Alzheimer's disease. A systematic review. *Dement Neuropsychol* 8:66–71, 2014.
82. Ziyatdinova S, Gurevicius K, Kutchiashvili N, Bolkvadze T, Nissinen J, Tanila H, et al. Spontaneous epileptiform discharges in a mouse model of Alzheimer's disease are suppressed by antiepileptic drugs that block sodium channels. *Epilepsy Res* 94:75–85, 2011.
83. Kim DY, Carey BW, Wang H, Ingano LAM, Binshtok AM, Wertz MH, et al. BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol* 9:755–64, 2007.
84. Holth JK, Bomben VC, Reed JG, Inoue T, Younkin L, Younkin SG, et al. Tau loss attenuates neuronal network hyperexcitability in mouse and *Drosophila* genetic models of epilepsy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:1651–9, 2013.
85. DeVos SL, Goncharoff DK, Chen G, Kebodeaux CS, Yamada K, Stewart FR, et al. Antisense reduction of tau in adult mice protects against seizures. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:12887–97, 2013.
86. Bernardi S, Scaldaferrri N, Vanacore N, Trebbastoni A, Francia A, D'Amico A, et al. Seizures in Alzheimer's disease: a retrospective study of a cohort of outpatients. *Epileptic Disord Int Epilepsy J Videotape* 12:16–21, 2010.
87. D'Orsi G, Specchio LM, Apulian. Study Group on Senile Myoclonic Epilepsy. Progressive myoclonus epilepsy in Down syndrome patients with dementia. *J Neurol* 261:1584–97, 2014.

88. De Simone R, Puig XS, Gélisse P, Crespel A, Genton P. Senile myoclonic epilepsy: delineation of a common condition associated with Alzheimer's disease in Down syndrome. *Seizure* 19: 383-9, 2010.
89. Nilsson D, Fohlen M, Jalin C, Dorfmueller G, Bulteau C, Delalande O. Foramen ovale electrodes in the preoperative evaluation of temporal lobe epilepsy in children. *Epilepsia* 50:2085-96, 2009.
90. Wang XH, Sun YX, Zhao JH, Xu AH. Grand total EEG as a predictive biomarker for cognitive impairment severity in cerebral infarcts of Chinese. *Clin EEG Neurosci* 45:158-62, 2014.
91. Fernández A, Maestu F, Amo P, Gil T, Fehr C. Focal temporoparietal slow activity in Alzheimer's disease revealed by magnetoencephalography. *Biol Psychiatry* 52: 764-770, 2002.
92. Fernández A, Arrazola F, Maestu, Amo J, Gil-Gregorio P, Wienbruch C. Correlations of hippocampal atrophy and focal low-frequency magnetic activity in Alzheimer disease: volumetric MR imaging-magnetoencephalographic study. *AJNR Am J Neuroradiol* 24: 481-487, 2003.
93. Holschneider DP, Leuchter AF. Beta activity in aging and dementia. *Brain Topogr* 8:169-179, 1995.
94. Holschneider DP, Leuchter AF, Uijtdehaage SH, Abrams M, Rosenberg-Thompson S. Loss of high-frequency brain electrical response to thiopental administration in Alzheimer's-type dementia. *Neuropsychopharmacology* 16: 269-275, 1997.
95. Lindau M, Jelic V, Johansson SE, Andersen C, Wahlund LO, Almkvist O. Quantitative EEG abnormalities and cognitive dysfunctions in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 15: 106-114, 2003.
96. Wada Y, Nanbu Y, Jiang ZY, Koshino Y, Yamaguchi N, Hashimoto T. Electroencephalographic abnormalities in patients with presenile dementia of the Alzheimer type: Quantitative analysis at rest and during photic stimulation. *Biol Psychiatry* 41: 217-225, 1997.

97. Babiloni C, Ferri R, Moretti DV, Strombi A, Binetti G, Dal Forno G. Abnormal fronto-parietal coupling of brain rhythms in mild Alzheimer's disease: a multicentric EEG study. *Eur J Neurosci* 19:2583-2590, 2004.
98. Huang C, Wahlund L, Dierks T, Julin P, Winblad B, Jelic V. Discrimination of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment by equivalent EEG sources: a cross-sectional and longitudinal study. *Clin Neurophysiol* 111: 1961-1967, 2000.
99. Dierks T, Jelic V, Pascual-Marqui RD, Wahlund L, Julin P, Linden DF. Spatial pattern of cerebral glucose metabolism (PET) correlates with localization of intracerebral EEG-generators in Alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol* 111: 1817-1824, 2000.
100. Gloor P, Ball G, Schaul N. Brain lesions that produce delta waves in the EEG. *Neurology* 27: 326-333, 1977.
101. Bozzali M, Falini A, Franceschi M, Cercignani M, Zuffi M, Scotti G. White matter damage in Alzheimer's disease assessed in vivo using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72: 742-746, 2002.
102. Hirono N, Kitagaki H, Kazui H, Hashimoto M, Mori E. Impact of white matter changes on clinical manifestation of Alzheimer's disease: a quantitative study. *Stroke* 31: 2182-2188, 2000.
103. Hansen LA, de Teresa R, Davies P, Terry RD. Neocortical morphometry, lesion counts, and choline acetyltransferase levels in the age spectrum of Alzheimer's disease. *Neurology* 38: 48-54, 1998.
104. Riekkinen P, Buzsaki G, Riekkinen P, Soininen H, Partanen J. The cholinergic system and EEG slow waves. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 78:89-96, 1991.
105. Riekkinen P, Sirviö Jr J, Riekkinen PJ. Relationship between EEG delta power and cortical ChAT content. *Neuroscience Research* 8 :12-20, 1990.

106. Holschneider DP, Leuchter AF, Walton NY, Scremin OU, Treiman DM. Changes in cortical EEG and cholinergic function in response to NGF in rats with nucleus basalis lesions. *Brain Res* 765: 228-237, 1997.
107. Holschneider DP, Waite JJ, Leuchter AF, Walton NY, Scremin OU. Changes in electrocortical power and coherence in response to the selective cholinergic immunotoxin 192 IgG-saporin. *Exp Brain Res* 126: 270-280, 1999.
108. Davis KL, Mohs RC, Marin D, Purohit, DP, Perl DP, Lantz M. Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *Jama* 281: 1401-1406, 1999.
109. DeKosky ST, Ikonomic SD, Styren L, Beckett S, Wisniewski DA. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 51: 145-155, 2002.
110. Tan, H.O., Reid. Reduced cortical inhibition in a mouse model of familial childhood absence epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104: 17536–17541, 2007.
111. Michael T. Heneka¹, Fabian Nadrigny^b, Tommy Regenc. Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology, by modulating microglial functions through norepinephrine. *PNAS* 107, 13: 6058–6063, 2010.
112. Pang CC, Upton AR, Shine G, Kamath MV. A comparison of algorithms for detection of spikes in the electroencephalogram. *IEEE Trans Biomed Eng* 50:521-6, 2003.
113. Hughes JR. Periodic lateralized epileptiform discharges: Do they represent an ictal pattern requiring treatment? *Epilepsy Behav* 18:162-5, 2010.
114. Aarts JH, Binnie CD, Smit AM, Wilkins AJ. Selective cognitive impairment during focal and generalized epileptiform EEG activity. *Brain* 107: 293-308, 1984.
115. Shewmon DA, Erwin RJ. Focal spike-induced cerebral dysfunction is related to the after-coming slow wave. *Ann Neurol* 23:131-7, 1988.

116. Hughes JR. The significance of the interictal spike discharge: a review. *J Clin Neurophysiol* 6:207-26, 1989.
117. Pressler RM, Robinson RO, Wilson GA, Binnie CD. Treatment of interictal epileptiform discharges can improve behavior in children with behavioral problems and epilepsy. *J Pediatr* 146:112-7, 2005.
118. Libenson MH, Caravale B. Do antiepileptic drugs differ in suppressing interictal epileptiform activity in children? *Pediatr Neurol* 2:214-8, 2001.
119. Duncan JS. Antiepileptic drugs and the electroencephalogram. *Epilepsia* 28:259-66, 1987.
120. Parmeggiani A, Fraticelli E, Rossi PG. Exacerbation of epileptic seizures by carbamazepine: report of 10 cases. *Seizure* 7:479-83, 1998.
121. Rocamora R, Wagner K, Schulze-Bonhage A. Levetiracetam reduces frequency and duration of epileptic activity in patients with refractory primary generalized epilepsy. *Seizure* 15:428-33, 2006.
122. Cavitt J, Privitera M. Levetiracetam induces a rapid and sustained reduction of generalized spike-wave and clinical absence. *Arch Neurol* 61:1604-7, 2004.
123. Snider, B.J., Norton, J., Coats, M.A. Novel presenilin 1 mutation (S170F) causing Alzheimer disease with Lewy bodies in the third decade of life. *Arch. Neurol* 62: 1821-1830, 2005.
124. Enz A1, Amstutz R, Boddeke H, Gmelin G, Malanowski J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 8:98:431, 1993.
125. Charlotte Bezzina, Laure Verret, H el ene Halley, Lionel Dahan, and Claire Rampon. Environmental enrichment does not influence hypersynchronous network activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 7: 178, 2015.
126. Eun-Hee Kim, Tae-Sung Ko. Cognitive impairment in childhood onset epilepsy: up-to-date information about its causes. *Korean J Pediatr* 59: 155–164, 2016.

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I:

a. **CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE ALZHEIMER**

B. **ICD-10 DEMENCIA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

C. ***Criterios del Texto Revisado de la cuarta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV-TR)***

9.1.1.1. ANEXO a

Criterios de NINCDS-ADRDA para la **enfermedad de Alzheimer**

Enfermedad de **Alzheimer probable**

- 1- Demencia establecida por el examen clínico y documentada por el Miniexamen del estado mental u otras pruebas similares.
- 2- Evidencia de déficit en dos o más áreas de la cognición.
- 3- Deterioro progresivo de la memoria y otras funciones cognoscitivas.
- 4- No hay trastorno de conciencia.
- 5- Comienzo entre 40 y 90 años, mas frecuentemente después de 65.
- 6- Ausencia de enfermedad sistémica y de otras enfermedades cerebrales que pudieran producir los trastornos mencionados.

Enfermedad de **Alzheimer posible**

- 1- Demencia establecida.
- 2- Variaciones en el comienzo o en el curso clínico.
.- Presencia de enfermedad sistémica o de otra enfermedad cerebral capaz de producir demencia, pero que no se considere como causa de la misma.

Enfermedad de **Alzheimer definida**

1- Presencia además del cuadro clínico típico, de evidencia histopatológica obtenida por biopsia o autopsia.

El grupo de expertos insiste en determinadas circunstancias que pueden poner en tela de juicio el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer.

Factores que hacen incierto el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer probable:

- 1- Comienzo súbito, apopléctico.
- 2- Signos neurológicos focales como hemiparesia, déficit sensitivo, déficit del campo visual o trastornos de la coordinación, tempranamente en la evolución de la enfermedad.
- 3- Convulsiones o ataxia al comienzo o muy tempranamente en la evolución de la enfermedad.

La sensibilidad y especificidad de los criterios del NINCDS-ADRDA, es de un 88 % y 79% frente al diagnóstico histopatológico.

Fuente: Kopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology. 2001; 56(9): 1143-53.

9.1.1.2. ANEXO b

ICD-10 DEMENCIA EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Other degenerative diseases of the nervous system (G30-G32)

G30	Alzheimer's disease
	<i>Incl.:</i> senile and presenile forms
	<i>Excl.:</i> senile: <ul style="list-style-type: none">• degeneration of brain NEC (G31.1)• dementia NOS (F03) senility NOS (R54)
G30.0	Alzheimer's disease with early onset <i>Note:</i> Onset usually before the age of 65
G30.1	Alzheimer's disease with late onset <i>Note:</i> Onset usually after the age of 65
G30.8	Other Alzheimer's disease
G30.9	Alzheimer's disease, unspecified

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD),

World Health Organization (WHO)

9.1.1.3. ANEXO c

1 Criterios del Texto Revisado de la cuarta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV-TR)

A.- Déficit cognitivo

- Deterioro de la memoria (deterioro de la capacidad para aprender información nueva o para recordar información aprendida previamente).
- Al menos una de las siguientes alteraciones cognitivas:
 - afasia (trastorno del lenguaje).
 - apraxia (deterioro de la capacidad para llevar a cabo actividades motoras pese a estar intacta la función motora).
 - agnosia (fallo en el reconocimiento o identificación de objetos pese a estar intacta la función sensorial).
 - alteración en la función ejecutiva (por ejemplo: planificación, organización, secuenciación o abstracción).

B.- los déficits cognitivos de los criterios definidos en el apartado A causan un deterioro significativo laboral y/o social y suponen una merma con respecto al nivel funcional previo del paciente.

C.- El comienzo es gradual y el curso continuado.

D.- los déficits de los criterios A1 y A2 no son debidos a

- Otra enfermedad del Sistema Nervioso Central (SNC) que pueda causar déficit progresivo de la memoria, como por ejemplo enfermedad vascular cerebral, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia a presión normal o tumor cerebral.
- Enfermedades sistémicas que se sabe que producen demencia, como por ejemplo hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B12 o de ácido fólico, déficit de niacina, hipercalcemia, neurosífilis o infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
- Estados inducidos por sustancias.

E.- los déficits no aparecen de manera exclusiva en el curso de un delirium (aunque éste puede superponerse a la demencia).

F.- los déficits no se explican mejor por la presencia de otro trastorno *Axial I* como depresión mayor o esquizofrenia.

9.2. ANEXO II

CRITERIOS DETERIORO COGNITIVO SEGÚN PETERSON

Existen varios criterios para el diagnóstico de Deterioro Cognitivo Leve, pero los más aceptados y utilizados son los de Petersen et ál.

- Pérdida de memoria, referida por el paciente o por un informador fiable.
- Facultad de memoria inferior en 1.5 SD (*desviaciones estándar*) o más por debajo de la media para su edad.
- Cognición general normal.
- Normalidad en las actividades de la vida diaria.
- Ausencia de criterios diagnósticos de demencia.

9.3. ANEXO III

European Consortium on Alzheimer's Disease (EADC) propone otra forma de diagnóstico:

En primer lugar, el Deterioro Cognitivo Leve (DCL) debería corresponderse con lo siguiente:

1. Quejas cognoscitivas procedentes del paciente y/o su familia.
2. El sujeto y/o el informador refieren un declive en el funcionamiento cognoscitivo en relación con las capacidades previas durante los últimos 12 meses.
3. Trastornos cognoscitivos evidenciados mediante evaluación clínica: deterioro de la memoria y/u otro dominio cognoscitivo.
4. El deterioro cognoscitivo no tiene repercusiones principales en la vida diaria, aunque el sujeto puede referir dificultades concernientes a actividades complejas del día a día.
5. Ausencia de demencia.

Estos 5 criterios hacen posible identificar un "Síndrome de DCL", lo que constituye el primer paso del procedimiento diagnóstico.

En segundo lugar, ha de reconocerse el subtipo de DCL: amnésico, no amnésico de múltiples dominios cognoscitivos, o no amnésico de un solo dominio cognoscitivo (distinto de la memoria).

Finalmente, debe ser identificado el subtipo etiopatogénico.

El procedimiento diagnóstico propuesto por el EADC hará posible identificar a pacientes con un riesgo elevado de progresión hacia la demencia, y también establecer estrategias terapéuticas específicas más adaptadas a estadios precoces, junto con un manejo global más estructurado.

9.4. ANEXO IV

Definición conceptual de crisis y epilepsia. Report 2005. Epilepsia, 55(4):475–482, 2014

Definición conceptual de las convulsiones y la epilepsia informe de 2005

Una crisis epiléptica es un evento transitorio de signos y / o síntomas debido a neuronal excesiva o anormal actividad sincrónica en el cerebro.

La epilepsia es un trastorno del cerebro que se caracteriza por una perdurable predisposición para generar ataques epilépticos, y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición.

La definición de la epilepsia requiere de al menos un ataque epiléptico

9.5. ANEXO V

Definición clínica de la epilepsia Report 2005. *Epilepsia*, 55(4):475–482, 2014

Operacional (práctica) definición clínica de la epilepsia

La epilepsia es una enfermedad del cerebro definido por cualquiera de las siguientes condiciones:

1. Al menos dos convulsiones no provocadas (o reflejas) que ocurren > 24 h de diferencia.
2. Una no provocada (o refleja) convulsión y una probabilidad de crisis futuras similar al riesgo de recurrencia general (al menos el 60%) después de dos convulsiones no provocadas, que se producen durante los próximos 10 años.
3. Diagnóstico de un síndrome epiléptico.

La epilepsia se considera que resuelve en personas que tenían un síndrome de epilepsia dependiente de la edad, pero están ahora más allá de la edad aplicable o los que se han mantenido libres de crisis durante los últimos 10 años, sin medicamentos para las convulsiones de los últimos 5 años.

9.6. ANEXO VI

ACTIVIDAD ELECTROENCEFALOGRAFICA EN HUMANOS

La actividad electroencefalográfica o EEG registra desde electrodos colocados sobre el cuero cabelludo la actividad sináptica de las neuronas de la corteza cerebral. Fundamentalmente se registra la actividad de las neuronas piramidales porque están situadas de forma ordenada espacialmente, con sus dendritas apicales dirigidas hacia la superficie de la corteza cerebral.

Un caso especial de registro de esta actividad es el electrocorticograma o EcoG, que se realiza mediante electrodos colocados en el interior de la corteza cerebral.

Dentro de la actividad electroencefalográfica se pueden distinguir diferentes ritmos u ondas cerebrales, que se diferencian por su frecuencia y localización, y que varían en las diferentes etapas del ciclo vigilia-sueño, niveles de alerta o actividades patológicas del sistema nervioso.

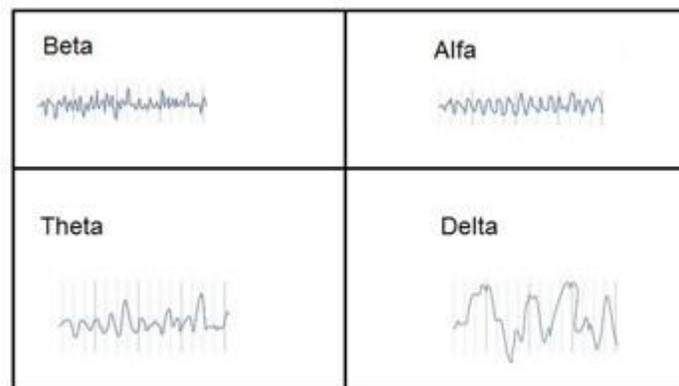
Ritmos basales del humano.

Podemos describir diferentes ritmos biológicos que encontramos en el EEG y, lógicamente también en el EcoG :

Ritmo Beta (β) y Gamma (γ):
Aparecen de forma más acusada cuando el individuo tiene una actividad mental intensa o en estados de máxima alerta. Su frecuencia oscila entre 13 y 30 Hz, el ritmo β y con frecuencias >30 Hz el ritmo γ . Tienen una amplitud entre 2 y 20 μ V. Estas ondas cerebrales se detectan normalmente en los lóbulos parietal y frontal del cerebro.
Ritmo Alfa (α):
se registran cuando una persona se encuentra en un estado de relajación sensorial y psíquica, por el contrario cuando la persona está realizando un esfuerzo mental su amplitud disminuye o desaparece. Tienen una frecuencia entre 8 y 12 Hz y una amplitud entre 20 y 60 μ V. Estas ondas podemos captarlas con mayor amplitud en el lóbulo occipital.
Ritmo Theta (θ):
Está presente en niños, y en adultos en un estado de sueño ligero, estrés o ansiedad. Su frecuencia varía entre 4 y 7 Hz y una amplitud entre 20 y 100 μ V. Podemos registrarlo en el lóbulo temporal.
Ritmo Delta (δ):
Surge principalmente en el sueño profundo y en niños menores de 1 año. Muy raras veces se pueden experimentar estando despierto y si aparecen indican la existencia de una patología. Estas ondas tienen una frecuencia de oscilación entre 1 y 3 Hz y su amplitud varía entre 20 y 200 μ V.

La actividad cerebral se registra mediante tres técnicas fundamentales:

Electroencefalografía (EEG), que es el enfoque más común porque es un método no invasivo y de bajo coste, Electroencefalografía (ECoG), que es una forma de registro del EEG invasiva, donde los electrodos son ubicados directamente sobre la superficie o en la profundidad de la corteza cerebral; estos dos tipos de registro se realizan mediante electrodos conectados a un electroencefalógrafo. El tercer sistema de registro es el Magnetoencefalografía (MEG), es un método no invasivo que permite obtener mapas de la actividad cerebral con una alta resolución espacial debido a que pueden colocarse sobre el cuero cabelludo un gran número de sensores. Se miden directamente los campos magnéticos que se generan por la actividad neuronal. Las ondas magnéticas no se atenúan por los tejidos por lo que permite medir las señales con mayor precisión y no son necesarios electrodos en contacto con la piel. Sin embargo, el equipo es extremadamente caro y voluminoso, por lo que su uso se restringe a casos especiales.



Ondas cerebrales registradas en el EEG

En la Enfermedad de Alzheimer, se han visto tres efectos principales sobre el EEG:

- | | |
|----|--|
| a. | Una disminución de la frecuencia de la señal EEG, que se traduce en un aumento de potencia de las señales a bajas frecuencias (bandas delta y theta, entre 0.5Hz y 8 Hz) y una disminución de la energía en las frecuencias más altas (bandas alfa y beta, de 8Hz a 30Hz), |
| b. | Un decremento de la complejidad de la señal EEG, por lo que las señales pasan a ser más regulares y más fácilmente predecibles, y una disminución de la sincronía de la señal EEG, |
| c. | La dependencia estadística entre señales EEG espontáneas de diferentes canales es generalmente menor en los sujetos con Alzheimer respecto de los sujetos controles de edad similar. |