

**INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
DE LA HABANA**

FACULTAD DE MEDICINA “COMANDANTE MANUEL FAJARDO”

INSTITUTO DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

***EVALUACIÓN NEUROQUÍMICA
DE LA NEUROPATÍA ÓPTICA
EPIDÉMICA***

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas.**

ALINA GONZÁLEZ-QUEVEDO MONTEAGUDO

**La Habana
2003**

*A Eli,
En humilde homenaje a su memoria*

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Santiago Luis González, que como director del INN me dio la oportunidad de realizar una parte de este trabajo en Venezuela, para lo cual tuve que abandonar durante varios meses mi labor en la Vicedirección de Investigaciones, que fue asumida por los Drs. Miguel Angel Alvarez y Joel Gutiérrez, sin cuyo apoyo incondicional no hubiera podido concluir.

A mi familia, que tuvo que afrontar durante muchos meses las responsabilidades domésticas, sobre todo a mi madre, que llevó sobre sus hombros una carga demasiado pesada para sus años y a mis hijos, que además de ser maravillosos, me apoyaron en numerosas ocasiones con la edición del documento de tesis.

A la Dra. Lucimey Lima Pérez, jefe del Laboratorio de Neuroquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), profesional de altísimo nivel en las neurociencias, que me apoyó y asesoró todo el trabajo realizado en su laboratorio y que ha llegado a ser además una gran amiga personal.

A los Lic. Mary Urbina y Francisco Obregón con quienes trabajé codo a codo en el IVIC durante muchos meses; a la Sra. Isabel Otaegui, de quien recibí un gran apoyo para el trabajo secretarial y en general a todos mis queridos amigos del Laboratorio de Neuroquímica del IVIC que siempre estuvieron prestos a ayudar en la difícil situación que representa encontrarse lejos de la familia y el país.

Al CONICIT (FONACIT) de Venezuela, al MINSAP de Cuba, al IVIC, a la Universidad de Naciones Unidas y a la Academia de Ciencias del Tercer Mundo que financiaron el trabajo contenido en esta tesis.

A las Lic. Rebeca Fernández e Ileana Alfaro, con quienes compartí innumerables sesiones de trabajo en la investigación de la neuropatía epidémica y a las

técnicas Irma Vicente y May Liz Valdés que participaron en el procesamiento de las muestras biológicas. En general a todos mis compañeros del Laboratorio de Neurobioquímica del INN en quienes siempre he encontrado un apoyo incondicional.

A los Drs. Rosaralis Santiesteban, Santiago Luis, Carmen Serrano y Humberto González que realizaron toda la evaluación clínica de los pacientes.

A la Lic Tamara Roussó, investigadora joven del Laboratorio de Farmacología del INN, que participó en los experimentos con animales y con quien compartí en el IVIC largas horas de trabajo, así como momentos de alegría y de tensión.

A la Dra. Rosa Lara, neuróloga hoy del Hospital Universitario “Calixto García Iñiguez”, pero que en el momento de aparición de la epidemia de neuropatía, trabajaba en el Hospital General de Pinar del Río y fue la primera persona que se nos acercó con la preocupación de investigar esta enfermedad.

A la Dra. Janis Eells, destacada investigadora de la Universidad de Winsconsin en EE.UU., quien desde 1994 ha brindado apoyo material para el trabajo del Laboratorio de Neurobioquímica del INN y con quien colaboramos para la realización de estudios bioquímicos en los pacientes, que aunque no forman parte de este trabajo de tesis, sirvieron de antecedentes para la planificación de la investigación.

A todos mis compañeros del INN que de una manera u otra han contribuido al desarrollo de este trabajo.

INDICE

Síntesis	1
I. Introducción	2
II. Revisión Bibliográfica	8
2.1 La epidemia de neuropatía en Cuba	8
2.2 Intoxicación por metanol	16
2.3 Barrera hematoencefálica y composición proteica del líquido cefalorraquídeo	21
2.4 Los aminoácidos en el sistema nervioso	24
III. Materiales y Métodos	30
3.1 Investigaciones en pacientes	30
3.1.1 Pacientes y controles para el estudio de proteínas del LCR	30
3.1.2 Pacientes y controles para el estudio de aminoácidos	32
3.1.3 Procedimientos para la obtención de las muestras de suero y LCR	33
3.1.4 Reactivos utilizados	33
3.1.5 Técnicas analíticas	34
A) Estudio proteico del LCR	34
B) Análisis de aminoácidos en suero y LCR	36
3.2 Experimentos en animales	37
3.2.1 Biomodelos	37
A) Administración crónica de metanol con suplemento de taurina	38
B) Administración crónica de metanol y déficit de taurina	39
3.2.2 Procedimientos para la obtención y preparación de sangre y tejidos	40
3.2.3 Técnicas analíticas	41
A) Determinación de proteínas totales	41
B) Determinación de formato sanguíneo	41
C) Análisis de aminoácidos	42
3.3 Análisis estadístico	43
IV. Resultados	44
4.1 Neuropatía óptica epidémica	44
4.1.1 Descripción clínica de los pacientes	
4.1.2 Análisis de las proteínas del LCR en pacientes con neuropatía óptica epidémica	46
4.1.3 Análisis de aminoácidos en suero y LCR de pacientes con neuropatía óptica epidémica y endémica.	52
4.2 Administración crónica de metanol en animales de experimentación	56
4.2.1 Administración crónica de metanol en ratas y suplemento de Tau	56

A) Niveles de formato en sangre de ratas tratadas con metanol	56
B) Análisis de aminoácidos	57
4.2.2 Administración crónica de metanol en animales con déficit de taurina	59
A) Determinación de la concentración de formato en sangre	59
B) Análisis de aminoácidos	59
V. Discusion	63
5.1 Neuropatía óptica epidémica	63
5.1.1 Estado funcional de la barrera hematoencefálica y composición de proteínas del LCR en pacientes con NOE	63
5.1.2 Patrón de aminoácidos en el suero de pacientes con NOE	66
5.1.3 Patron de aminoácidos en el LCR de pacientes con NOE	70
5.2 Experimentos en animales	73
5.2.1 Efectos de la administración crónica de metanol	73
5.2.2 Efecto de las variaciones en el contenido de taurina sobre los cambios producidos por la administración crónica de metanol	77
5.2.3 Integración de los resultados de los estudios en humanos y en animales de experimentación	79
VI. Conclusiones	85
VII. Recomendaciones	86
VIII. Referencias bibliograficas	87
IX. Anexos	112

Abreviaturas:

AAT	Aspartato aminotransferasa
Ala	Alanina
β -Ala	β -alanina
AMPA	a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
Asp	Aspartato
Asn	Asparagina
ATA	Ambliopía tabaco alcohólica
ATP	Adenosín trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
CIDP	Polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante
CV	Coeficiente de variación
EFP	Electroforesis de proteínas
EM	Esclerosis múltiple
ERG	Electrorretinograma
EROs	Especies reactivas del oxígeno
GABA	Ácido ganma aminobutírico
GES	Guanidinoetano sulfonato
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
Ile	Isoleucina
IVIC	Instituto Venezolano de Investigacions Científicas
Kainato	Kainato
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Leu	Leucina
LHON	Neuropatía òptica hereditaria de Leber
Lys	Lisina
MeOH	Metanol
Met	Metionina
MTX	Metotrexate
NE	Neuropatía epidémica
NMDA	N-metil-d-aspartato
NOE	Neuropatía óptica epidémica
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Phe	Fenilalanina
PT	Proteínas totales
Ser	Serina
SNC	Sistema nervioso central
Tau	Taurina
THF	Tetrahidrofolato
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina

SINTESIS

La aparición súbita en Cuba de una epidemia de neuropatía óptica en 1992, desencadenó una serie de investigaciones dirigidas a esclarecer las causas subyacentes. El presente trabajo investigó la participación del balance de aminoácidos sistémicos y en el sistema nervioso, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y la neurotoxicidad del metanol en la fisiopatología de la neuropatía óptica epidémica (NOE). Se llevaron a cabo estudios en pacientes con NOE y en un modelo experimental de toxicidad crónica por metanol en ratas Sprague Dawley a las cuales se les produjo un incremento de formato (metabolito tóxico del metanol) por la administración de metotrexate. Se evaluó el estado funcional de la BHE en pacientes con NOE por electroforesis de proteínas del LCR y por el cálculo de la relación albúmina LCR/albúmina suero. La concentración de formato en sangre se determinó por un método fluorimétrico y las de aminoácidos en flúidos biológicos de pacientes y en tejido nervioso de animales de experimentación, por HPLC con detección fluorescente. Se demostró la presencia de daño de la BHE relacionado con la mayor severidad neurológica, en aproximadamente la cuarta parte de los pacientes. Los estudios de aminoácidos séricos revelaron disminución de taurina (asociada con una mayor severidad oftalmológica), treonina y aspartato, con un buen grado de conservación de los niveles de aminoácidos esenciales tanto en los controles como en los pacientes. En el LCR de los pacientes se observó un incremento de aminoácidos excitatorios (aspartato y glutamato), mientras que en el nervio óptico de los animales con hiperformatemia por la administración crónica de metanol, se detectó incremento de aspartato. En humanos se concluyó que no existía una situación carencial de base en los sujetos no afectados, ni en los pacientes con NOE, en lo que se refiere al contenido de aminoácidos esenciales; aunque sí se puso de manifiesto una disminución selectiva de taurina que pudiera haber participado en la fisiopatología de la forma óptica de la enfermedad. Las investigaciones en humanos y en animales de experimentación, evidenciaron la existencia de un desbalance de aminoácidos que favorece la excitotoxicidad, un incremento de la permeabilidad de la BHE y una asociación del tóxico mitocondrial, formato, con la presencia de excitotoxicidad. Estos procesos pueden favorecer el estado de estrés oxidativo ya reportado anteriormente en la NOE y alterar la homeostasis del sistema nervioso, habiendo contribuído así al desarrollo de la enfermedad.

I. INTRODUCCIÓN

La investigación de los mecanismos moleculares que participan en la fisiopatología de las enfermedades neurológicas continúa siendo un campo de gran interés para la neurobiología moderna. A nadie puede escapar que la profundización en el conocimiento de muchas enfermedades del sistema nervioso, impulsado por los resultados del Proyecto Genoma Humano (Eaton, 2003), han localizado las lesiones a nivel molecular y han influido de una manera impresionante en el aporte de nuevas posibilidades terapéuticas. En este panorama, la neuroquímica ha alcanzado un desarrollo muy destacado durante la última década, indisolublemente relacionada con otras disciplinas como la inmunología, farmacología, biología molecular y genética, sin que puedan definirse fronteras.

La aparición súbita en Cuba de una epidemia de neuropatía óptica en 1992, calificada como la epidemia neurológica más grande del siglo (Román, 1994), desencadenó una serie de investigaciones dirigidas a esclarecer las causas subyacentes. Las epidemias de mieloneuropatías tropicales han sido reportadas desde el siglo antepasado. Sin embargo, a pesar de que existen elementos que las asocian con factores tóxicos y nutricionales, la comprobación bioquímica de alteraciones específicas en estas entidades ha sido controvertida (Román y col, 1998). Desde un inicio se sospechó que la neuropatía epidémica (NE) pudiera estar relacionada con algún grado de déficit nutricional, y se postuló que la etiología más probable pudiera ser una lesión metabólica por disfunción mitocondrial que afectara selectivamente vías neuronales que requieren un alto consumo de energía (Román, 1994). La NE en Cuba y sobre todo su forma óptica, se clasificó como una neuropatía tóxico-nutricional tropical de etiología multifactorial, con signos ópticos y/o periféricos (Pérez Cristiá y Fleites Mestre, 1995; Borrajero y col, 1994). Para explicar el desencadenamiento de la enfermedad se ha propuesto la intervención de diferentes factores: tóxicos, nutricionales, genéticos y virales (CDC, 1994; CNFIT, 1995).

Las asociaciones epidemiológicas situaron entre los factores de riesgo más sobresalientes al tabaquismo, la ingestión de bebidas alcohólicas, la pérdida de peso, el ejercicio físico y la falta de alguna de las comidas del día (CDC, 1994; CNFIT, 1995; Bonet y col, 2000). Se reportó deficiencia de tiamina en la población (Macías Matos y col, 1996), déficit de sustancias antioxidantes (CNFIT, 1995; Barnouin y col, 2001; Arnaud y col, 2001a), de folatos (Eells y col, 2000b) y la presencia de un virus en el LCR (Más y col, 1997). El descenso dramático de la incidencia de pacientes con el tratamiento multivitamínico preventivo a la población en mayo de 1993, y la mejoría significativa de los pacientes tratados con vitaminas del complejo B, reforzó la creencia de una fuerte contribución del componente nutricional en la fisiopatología de la enfermedad (Llanos, 1993; Macías-Matos y col, 1996). Sin embargo, un estudio realizado dos años después del pico de incidencia de la epidemia, reveló que se mantenía un bajo consumo de energía y un *estatus* de déficit de vitaminas del complejo B en la población, sin que esto se correspondiera con una alta incidencia de casos de neuropatía (Arnaud y col, 2001b). Estos resultados y la disociación entre la evolución clínica de los pacientes y el estado nutricional vitamínico reportado por Rodríguez-Ojea y col (1998) apoyan la participación de otros factores no nutricionales en la etiopatogenia de la enfermedad.

Desde los comienzos de la epidemia se sugirió que el estrés oxidativo, dado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y el sistema de defensas antioxidantes, se encontraba en la base del proceso patológico (Pérez-Cristiá y Fleites-Mestre, 1995; Pérez-Cristiá, 1998). Las Investigaciones realizadas por científicos cubanos y extranjeros han llevado a plantear que los factores anteriormente mencionados (tóxicos, nutricionales, genéticos y virales) se conjugaron para afectar el funcionamiento del sistema nervioso a través de la producción de un estado energético deficitario, con reducción de las defensas antioxidantes e incremento de las especies reactivas del oxígeno (EROs) (Pérez Cristiá y Fleites Mestre, 1995; Sadun, 1998). Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial son dos procesos estrechamente interrelacionados, que finalmente

pueden conducir a una muerte celular selectiva (Simonian y Coyle, 1996; Cassarino y Bennett, 1999).

Sadun (1998) elaboró una hipótesis muy relacionada con la anterior, en la cual postula que las alteraciones observadas en esta enfermedad responden a una disfunción mitocondrial de origen tóxico-nutricional, que interrumpe la fosforilación oxidativa, produciendo un déficit crónico de ATP. Las características clínicas de la forma óptica de la NE son muy similares a lo que se ha descrito en otras neuropatías ópticas asociadas a disfunción mitocondrial: genéticas (enfermedad de Leber), tóxicas (cianuros, metanol, monóxido de carbono, etambutol, cloranfenicol), nutricionales (déficit de cobalamina, tiamina, riboflavina y ácido fólico) y tóxico-nutricionales (ambliopía tabaco-alcohólica, neuromielopatías tropicales) (Carelli y col, 2002). Entre los factores de riesgo relacionados con la NE se incluyó también la exposición a toxinas mitocondriales conocidas: metanol (Sadun y col, 1994; Eells y col, 2000b) y cianuro (Román, 1994; CNFIT, 1995), en el marco de una deficiencia nutricional generalizada (Tucker y Hedges, 1993; CNFIT, 1995). Una investigación llevada a cabo por el Instituto de Neurología y Neurocirugía con la Universidad de Wisconsin en EEUU (Eells y col, 2000b), puso de manifiesto un incremento de los niveles de formato (metabolito tóxico del metanol) y deficiencia de folatos en pacientes con NOE, y nos llevó a inferir que deficiencias nutricionales que conllevan a disminución de folatos y la ingestión de pequeñas cantidades de metanol en las bebidas alcohólicas o de otras fuentes naturales, pudieran haber contribuido a la producción de estados energéticos deficitarios que facilitarían la afectación del nervio óptico y podrían haber contribuido a la aparición de neuropatía óptica en algunos pacientes. No obstante, los efectos crónicos de dosis subtóxicas de metanol sobre el sistema nervioso y especialmente sobre las vías visuales son escasos y sus resultados muy controvertidos. Por lo tanto, resultaba de interés comprobar si la administración de metanol en bajas dosis era capaz de producir alteraciones bioquímicas en el tejido nervioso de animales de experimentación, lo cual pudiera aportar elementos para la comprensión de los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad en humanos.

Los aminoácidos juegan un papel muy importante en el funcionamiento del sistema nervioso, no solamente como unidades básicas para la síntesis de proteínas, sino también por sus propiedades neuroactivas (neurotransmisores, precursores de neurotransmisores, neuromoduladores), y otras (osmorreguladores, detoxificantes, antioxidantes). Los antecedentes epidemiológicos indicaban que en la NE había una ingestión de aminoácidos esenciales por debajo del 70% de las cantidades recomendadas (Porrata y col, 1995). Por la semejanza de la NOE con la ambliopía tabaco-alcohólica, existía la sospecha de que la composición de aminoácidos esenciales y sobre todo de los azufrados (metionina y cisteína), pudiera estar afectada en esta entidad como consecuencia de deficiencias alimentarias (CNFIT, 1995; Sadun y col, 1994), ya que estos aminoácidos participan, conjuntamente con algunas vitaminas, en los procesos naturales de detoxificación del organismo y especialmente en la detoxificación del cianuro (Dang, 1981). Por otro lado, la taurina resultaba de particular interés dado su reconocido efecto sobre el desarrollo, la regeneración y la nutrición del sistema nervioso y especialmente de la retina y nervio óptico (Lima et al, 1992; 1999; Lombardini, 1992), además de poseer propiedades antioxidantes (Koyama y col, 1992).

El desbalance de aquellos aminoácidos con función neuroactiva (excitatorios e inhibitorios), es un campo de investigación obligado, pero hasta el momento no explorado en la NE. Se ha demostrado que la acción deletérea de los aminoácidos excitatorios cuando alcanzan concentraciones excesivas en el tejido nervioso (excitotoxicidad) se encuentra en la base de los mecanismos que conducen a la muerte neuronal en algunas enfermedades neurodegenerativas (Spreux-Varoquax y col, 2002; Tzschentke, 2002). Existe un hilo conductor común entre excitotoxicidad y daño oxidativo, ya que ambos procesos son secundarios a defectos en el metabolismo energético (Dawson y col, 1995). De hecho, se ha demostrado que la tiamina protege a las neuronas de la retina contra la excitotoxicidad por glutamato (Kaneda y col, 1997).

Por otro lado, existen evidencias de que el estrés oxidativo, la excitotoxicidad y el déficit de tiamina provocan ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE)

(Cardelli y col, 2002; Noseworthy y Bray, 1998) y por esa vía también afectan la homeostasis del tejido nervioso, exponiéndolo a cambios en la composición de metabolitos y toxinas procedentes de la sangre. En estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio (González-Quevedo y col, 1993) se constató que en aproximadamente la cuarta parte de los pacientes con la forma óptica de la NE había un incremento de la permeabilidad de la BHE.

La investigación de la etiología y fisiopatología de la NE resulta tan amplia y compleja, que no es posible abarcar en un trabajo todas las posibilidades y mucho menos dilucidar las bases moleculares de la enfermedad. Sin embargo, teniendo en cuenta los argumentos previamente expuestos, queda en evidencia que en la fisiopatología de la NE pueden intervenir procesos aun no investigados (excitotoxicidad, permeabilidad de la BHE, neurotoxicidad del metanol), que al alterar la homeostasis del sistema nervioso, pueden conducir finalmente a la muerte celular.

En el presente trabajo se realizó una evaluación de la fisiopatología de la forma óptica de la NE (NOE), a través de la exploración de varias variables neuroquímicas, que consideramos puede brindar un cuadro más completo del proceso fisiopatológico que interviene en el desarrollo de esta enfermedad y sentar las bases para sugerir nuevas estrategias en la terapéutica y prevención no solamente de la NOE, sino también de un amplio espectro de neuropatías ópticas. De acuerdo a los antecedentes anteriormente mencionados y a los resultados encontrados en nuestras investigaciones, desarrollamos el presente trabajo de tesis bajo el título: *Evaluación Neuroquímica de la Neuropatía Óptica Epidémica*.

Hipótesis del trabajo de tesis:

Sobre la base de los criterios experimentales y antecedentes planteados anteriormente, nos hemos propuesto la siguiente hipótesis de trabajo:

El desbalance aminoacídico facilita la pérdida de la homeostasis en el sistema nervioso, desencadenando procesos de estrés oxidativo, toxicidad, excitotoxicidad y el concomitante daño de la barrera hematoencefálica, todo lo cual contribuye a la fisiopatología de la neuropatía óptica epidémica.

Para evaluar nuestra hipótesis de trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Demostrar la existencia de una pérdida de la homeostasis del sistema nervioso en la neuropatía óptica epidémica por desbalances de los aminoácidos y disfunción de la barrera hematoencefálica.

Objetivos específicos:

1. Determinar el estado funcional de la barrera hematoencefálica en pacientes con NOE.
2. Determinar el perfil de aminoácidos en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con NOE.
3. Determinar el efecto de la exposición crónica a niveles subtóxicos de formato sobre el contenido de aminoácidos en retina, nervio óptico, hipocampo y corteza posterior en ratas tratadas con metanol.
4. Determinar el efecto de la suplementación de taurina o de su deficiencia sobre las variables bioquímicas estudiadas en los animales tratados crónicamente con metanol.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

2.1 La epidemia de neuropatía en Cuba.

Los síndromes neuromielopáticos tropicales han sido descritos desde finales del siglo XIX. A estos reportes no se les prestó mucha atención hasta que durante la II Guerra Mundial los neurólogos se percataron de las relaciones entre clima, medio ambiente, nutrición y la ocurrencia epidémica de mieloneuropatías. Los mecanismos involucrados en la aparición de estas epidemias sugieren una causa multifactorial, pero en casi todas ellas prevalecen los factores nutricionales y tóxicos (tabaco, alcohol, cianuro, drogas y medicamentos) (Román, 1998).

Se han descrito mieloneuropatías atáxicas tropicales de origen nutricional, caracterizadas por neuropatía dolorosa, dermatitis urogenital y ambliopía en muchos países de esta región: Africa Oriental, Guinea Británica, Jamaica, Islas Seychelles, Somalia, Egipto, Liberia, Nigeria, Kenya y otros (Osuntokun y Osuntokun, 1971; Román, 1998; Oluwole y col, 2000). Recientemente en Tanzania, Plant y col (1997) describieron una epidemia de neuropatía óptica, con características similares al Strachan (Santiesteban, 1997), fundamentalmente en la población joven, cuya etiología, aunque hipotéticamente relacionada con el déficit de algún micronutriente, no se ha podido establecer.

En 1898, Domingo L. Madan, un prestigioso médico matancero, reportó en la Crónica Médico Quirúrgica de La Habana, la aparición en 4 meses, de más de 80 casos de ambliopía, coincidiendo con el bloqueo de la isla por la Marina de los EE.UU. y la reconcentración de Weyler. En la Cuba post colonial no se volvieron a repetir reportes de epidemias mieloneuropáticas hasta el comienzo de la década de los 90, en que se repitieron circunstancias históricas similares a las que se presentaron hace cien años: crisis económica, recrudecimiento del bloqueo de EE.UU. y neuropatía epidémica. La descripción clínica de la neuropatía epidémica que se desarrolló en Cuba a principios de la década de los noventas y su base causal son muy similares a las descritas por Madan y Strachan a finales del siglo XIX. Una extensa revisión, comparando la epidemia

de neuropatía en Cuba con otras epidemias y enfermedades similares en el mundo se presenta en el libro de Santiesteban (1997).

Al finalizar 1991 aparecieron un número inusual de pacientes con neuropatía óptica bilateral en la provincia de Pinar del Río (Llanos, 1993). Estos casos eran fundamentalmente adultos del sexo masculino, con antecedentes de tabaquismo y alcoholismo en su mayoría, que procedían generalmente de áreas tabacaleras y acudían a la consulta de oftalmología por déficit visual bilateral, dificultad en la visión de colores y fotofobia de instalación subaguda (Ramírez y col, 1995). Las principales características clínicas eran disminución de la agudeza visual, escotoma central o cecocentral, alteración de la visión a color y ausencia del haz papilomacular (Sadun, 1994). Posteriormente comenzaron a aparecer formas periféricas y mixtas, presentándose con combinaciones de neuropatías periféricas sensitivas y disautonómicas, y en algunos casos mielopatía sensorial, paraparesia espástica o sordera sensorial. En ambas formas clínicas - óptica y periférica - fue común la presencia de fatiga y pérdida de peso (Román, 1994). La enfermedad comenzó a extenderse, alcanzando proporciones epidémicas y para mediados de 1993 se llegaron a reportar 50 862 casos en toda la isla, para una incidencia acumulativa de 461.4 por 100 000 habitantes (CDC, 1994). Todo este proceso denominado neuropatía epidémica (NE) se caracterizó por una susceptibilidad para los dos sexos, con un predominio masculino para la forma óptica y femenino para la periférica, un marcado riesgo para los individuos entre 25 y 64 años de edad y por una distribución geográfica heterogénea (Ramírez y col, 1995). Las características clínicas y epidemiológicas de esta enfermedad fueron ampliamente revisadas por Batista y Serrano (1997).

No se presentaron muertes atribuibles a la enfermedad y la mayoría de los pacientes respondían favorablemente al tratamiento con altas dosis de vitaminas del complejo B (B₁, B₂, B₆, B₁₂), suplementos orales del Vit A y E, ácido fólico y una dieta rica en proteínas por un período de 10 días (Román, 1994). La intervención de la población en mayo de 1993, con el suministro profiláctico de complejo vitamínico B, frenó dramáticamente la incidencia de la enfermedad (Llanos, 1993). A pesar de que la recuperación de la mayoría de los pacientes

era casi total, quedaron un número importante de pacientes con secuelas ópticas moderadas y severas, muy limitantes para el desarrollo de una vida laboral y social normal. Después de 1994, la incidencia se ha mantenido en niveles endémicos, pero con una tendencia al descenso y con algunos brotes a nivel local (Santiesteban, 1997; Bonet y col, 2000).

Factores etiológicos involucrados en la neuropatía epidémica:

Dada la frecuencia con que se asociaba la enfermedad en los comienzos de la epidemia con el hábito de fumar y la ingestión de bebidas alcohólicas, se pensó en la presencia de una ambliopía tabaco-alcohólica (CDC, 1994; Santiesteban y col, 1997). Posteriormente se interpretó que esto sucedió como consecuencia de que los primeros individuos afectados fueron aquellos con mayores factores de riesgo y el desarrollo posterior de la enfermedad, con la aparición de formas puramente periféricas hizo pensar en otros factores etiológicos (CDC, 1994; Sadun y col, 1994).

Los resultados de los estudios clínicos, epidemiológicos (CNFIT, 1995; Mas-Bermejo y col, 1995; Gay y col, 1995) y morfológicos (Borrajero y col, 1994), los buenos resultados obtenidos con la terapia vitamínica en los pacientes y con la suplementación vitamínica en la población y la crítica situación económica del país que llevaron a marcadas escases de alimentos (Tucker y Hedges, 1993; CNFIT, 1995), apuntaban predominantemente hacia un origen tóxico-nutricional.

La investigación llevada a cabo por The Cuba Neuropathy Field Investigation Team (CNFIT, 1995) encontró una fuerte asociación entre el consumo de tabaco y la presentación de la NOE, con una relación evidente dosis-respuesta. Además, reportaron un riesgo menor de NOE en individuos con mayor consumo de nutrientes relacionados con productos animales (proteínas, grasas y metionina) y vitaminas del complejo B (fundamentalmente B₁₂, riboflavina, niacina y piridoxina). Otros autores también encontraron asociación entre tabaquismo, ingestión de bebidas alcohólicas y NE (Porrata y col, 1995; Pérez y col, 1998; Bonet y col, 2000). Además, Bonet y col (2000) señalaron otro factor de riesgo: el incremento de la actividad física con la reducción del per

cápita calórico, pero concluyeron que aunque estos 3 factores tenían un peso en los determinantes de la enfermedad, otros factores no definidos por ellos, pudieran explicar mejor la ocurrencia de los casos.

Porrata y col (1995) reportaron una ingestión marcadamente inferior de energía, proteínas totales y de origen animal, grasas y micronutrientes en los pacientes, estando la ingestión de todos los aminoácidos esenciales por debajo del 70% de las cantidades recomendadas. Gay y col (1995) plantearon la existencia de factores dietéticos de riesgo (baja ingestión de pan y arroz, no consumo de leche) y factores dietéticos de protección (mayor consumo de frijoles, viandas, aceite, productos cárnicos con soya).

Hay algunos estudios bioquímicos que sustentan la participación de los factores nutricionales en la epidemia. Macías-Matos y col (1996) demostraron una disminución de tiamina en la población general durante la epidemia. Aunque la deficiencia de tiamina no era mayor en pacientes que en controles, sí fue más frecuente en poblaciones donde la incidencia de la enfermedad era más elevada (67.6% de la población de Pinar del Río estudiada tenía algún déficit de tiamina, mientras que en Ciudad de la Habana sólo se detectó en el 37.4%). Posteriormente Rodríguez-Ojea y col (1998) estudiaron pacientes con NE y encontraron un incremento del porcentaje de individuos deficientes y marginales en tiamina y niacina al año de tratamiento, sin aparente relación con la evolución clínica de la enfermedad. También se detectó deficiencia de folatos en más del 50% de pacientes con NOE y acumulación de formato (metabolito tóxico del metanol) en el 25% (Eells y col, 2000b).

El estado de los sistemas antioxidantes ha sido abordado por diferentes autores. En la investigación de casos y controles llevada a cabo por The Cuba Neuropathy Field Investigation (CNFTI, 1995) se reportaron niveles más bajos de carotenoides séricos, especialmente licopenos en pacientes con NOE. Dado que el tabaquismo ha sido evidentemente un factor influyente en el proceso, se realizaron estudios en una población de hombres fumadores y no fumadores en Ciudad de la Habana y se encontró disminución de α y β -carotenos, β -criptoxantina, carotenoides totales, riboflavina, actividad de glutatión reductasa y

butirilcolinesterasa e incremento de cobre y tiocianatos en hombres fumadores (Barnouin y col, 2000). Una investigación llevada a cabo en una población de hombres de mediana edad del municipio La Lisa, demostró valores bajos de ingestión y de concentración sanguínea de carotenoides, vitamina E y Zn, por lo que concluyeron que esta población representaba un grupo de riesgo para la NE (Arnaud y col, 2001a).

Se realizaron estudios bioquímicos para investigar la afectación de la función mitocondrial. Rodríguez-Hernández y col, 2001 no detectaron defectos de la actividad de enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial en músculo esquelético de pacientes con NE, sin embargo sí encontraron actividades elevadas de la citocromo oxidasa, succinato deshidrogenasa y citrato sintasa, que sugerían la presencia de proliferación mitocondrial. Estos hallazgos, unidos al incremento de NADP^+ los llevó a plantear la existencia de alteraciones de la función mitocondrial en la NE.

La hipótesis tóxica fue extensamente investigada, dados los informes de intoxicaciones masivas que aparecen en la literatura (Román, 1994), sobre todo el caso de la intoxicación por clioquinol en Japón que afectó a más de 10 000 personas (Egashira y Matsuyama, 1982), dando el cuadro conocido por SMON (mieloneuropatía óptica subaguda). Desde los primeros momentos se investigaron las posibles toxinas en productos alimenticios, vegetales, frutas y bebidas alcohólicas y no se encontró presencia de metanol, pesticidas, arsénico, ni otros metales pesados. Se investigó además la toxicidad de varias plantas, en particular de la “caña santa” (*Cymbopogon citratus*), cuyo uso se había extendido, el contenido mineral de los suelos y tres productos en particular: ésteres organofosforados, tricloroetileno y cianuro, pero tampoco se obtuvieron resultados positivos (Román, 1994).

Sadun y col (1994) señalaron la presencia de aproximadamente un 1% de metanol en muestras de ron de producción artesanal tomadas en la provincia de Pinar del Río. Es bien conocido que el metanol, a través de su metabolito el ácido fórmico, es un tóxico mitocondrial, sobre todo en condiciones de deficiencia de folatos (Makar y Tephly, 1977). En una investigación llevada a cabo con la

Universidad de Wisconsin en EE.UU. se comprobó la presencia de un marcado déficit de folatos en más del 50% de los pacientes con NOE e incremento de formato (metabolito tóxico del metanol) en el 25% (Eells y col, 2000b). Con estos resultados se sugirió que deficiencias nutricionales que conlleven a disminución de folatos y la ingestión de pequeñas cantidades de metanol en las bebidas alcohólicas pudieran contribuir a la producción de estados energéticos deficitarios que facilitarían la afectación del nervio óptico y pudieran contribuir a la aparición de NOE en algunos pacientes. Estos elementos nos llevaron a plantear un diseño experimental para comprobar si en una situación de deficiencia de folatos y elevación ligera y prolongada de formato (sin llegar a los niveles observados en la intoxicación aguda) se podían producir alteraciones bioquímicas en diferentes regiones del sistema nervioso.

Aunque las investigaciones clínicas y epidemiológicas no favorecían la presencia de un agente infeccioso en la etiología de la NE, han sido muy discutidos los hallazgos relativos a la detección de un virus en el LCR de pacientes con NE (Más y col, 1997; Rodríguez y col, 1998; De la Fuente y col, 1999). Del LCR de pacientes se aislaron agentes virales que mostraron 2 tipos de efecto citopatogénico (ECP): uno típico de enterovirus en un número reducido de casos, que correspondieron con Coxackie A9 (CA9) y otro de efecto más ligero (ECP-L) en la mayoría de los pacientes, que estaban relacionados antigénicamente con los virus CA9 y Coxackie B4 (Más Lago, 1998). Pudo demostrarse la detección de anticuerpos que reconocen al virus CA9 en población sana, lo que indicaba su circulación (Más Lago, 1998).

Teniendo en cuenta los resultados de las investigaciones epidemiológicas, toxicológicas, nutricionales, histopatológicas y virológicas se propuso una hipótesis que trata de integrar la influencia de todos estos factores para el desencadenamiento de la NE. Esta hipótesis, desarrollada por Más Lago (1998) y Lago y col (2001), plantea que las infecciones primarias por enterovirus, ocurridas fundamentalmente en los primeros años de vida, afectan con frecuencia el sistema nervioso central, pudiendo dejar genomas o partes de éstos de forma latente en las células del sistema nervioso. Transcurrido un período de tiempo

dichos genomas pueden perder el estado de latencia debido a factores de naturaleza tóxica y/o deficitarios, haciendo que éstos se expresen. La expresión y replicación de estos ácidos nucleicos pueden producir partículas virales completas o incompletas, portadores de epítopes comunes con estructuras del sistema nervioso y con potencialidad para mediar un proceso de autoinmunidad. Las partículas incompletas pueden producir una infección persistente con la perpetuación del estímulo antigénico o producir daño por sí solas. Una interpretación muy cercana a esta fue desarrollada por Beck (2000), quien planteó que el estado nutricional del huésped puede tener una profunda influencia sobre el virus, de manera que un virus normalmente no virulento se puede hacer virulento como consecuencia de cambios en su genoma al replicarse en un huésped nutricionalmente deficiente.

El factor genético también fue investigado, dada la semejanza de los elementos clínicos de la enfermedad con la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON), buscando una predisposición genética que involucrara mutaciones del ADN mitocondrial (Hirano y col, 1994; John's y col, 1994), pero esto no fue confirmado posteriormente por otros autores (Newman y col, 1994; Rodríguez-Hernández y col, 2001). Se ha llegado al consenso de que las tres mutaciones de ADNmt en las posiciones nucleotídicas 11778/ND4, 3460/ND1 y 14484/ND6 son las que se encuentran en la mayoría de los casos de LHON en el mundo y todas afectan subunidades mitocondriales del complejo I, NADH:ubiquinona (Q) reductasa (Carelli y col, 2002). Santiesteban y col (1999) reportaron un incremento del diagnóstico de LHON durante el período de la epidemia, hicieron una comparación de las diferencias y semejanzas clínicas entre ambas entidades y concluyeron que muchos pacientes con LHON que debutaron durante la epidemia fueron erróneamente diagnosticados como NOE.

Debido a la semejanza clínica de la NOE con el LHON, Sadun (1998, 2002) postuló que estas dos enfermedades pudieran confluir en un mecanismo fisiopatológico común conducente a una alteración de la función mitocondrial, con la consiguiente reducción de la fosforilación oxidativa que da al traste con la producción de ATP. El LHON representaría una forma genética de insuficiencia

mitocondrial, mientras que la NOE pudiera representar una forma adquirida. Otras formas de neuropatías ópticas adquiridas se traducen en una disfunción mitocondrial (Carelli y col, 2002). Se ha reportado que la deficiencia severa de ácido fólico es suficiente para producir una neuropatía óptica bilateral muy semejante y se ha postulado que sea debido a una disfunción mitocondrial por acumulación de formato (Golnik y Schaible, 1994). La ambliopía tabaco-alcohólica (ATA) produce una pérdida visual con características muy similares a las enfermedades anteriormente mencionadas. En esta entidad, se señala que la ingestión reducida de vitamina B12, asociada con la ingestión de etanol y el cianuro del tabaco, complican el cuadro nutricional y la fosforilación oxidativa, dando lugar a una deficiencia crónica de ATP (Walsh y Hoyt, 1982; Román, 1994).

Basándose en el hecho de que muchos agentes tóxicos pueden producir daño histológico definitivo en el nervio óptico y de que la mayoría de éstos ejercen su acción a través de una disrupción de la función mitocondrial, Sadun (1998, 2002) postuló una hipótesis para explicar cómo y por qué

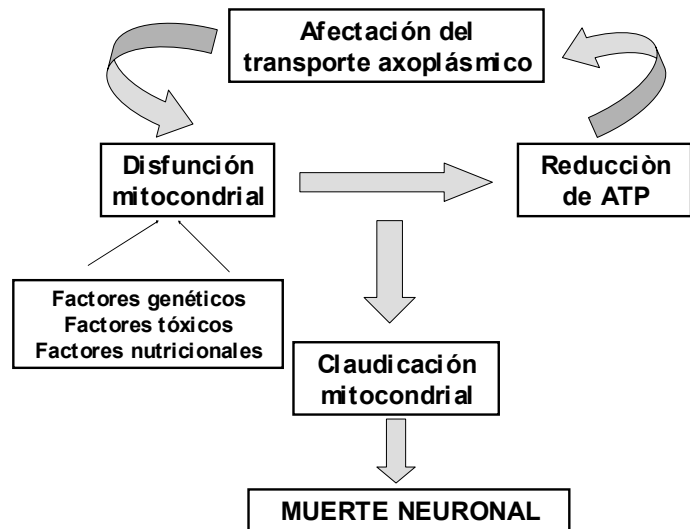


Fig 1: Círculo vicioso por déficit mitocondrial

en el contexto de una insuficiencia mitocondrial podría producirse un daño neurológico selectivo. El tejido nervioso posee poca capacidad glicolítica y depende casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa para la obtención de energía. Esto, unido a la alta demanda bioenergética, lo hacen particularmente vulnerable a la disfunción mitocondrial (Wallace y col, 1997). La insuficiencia mitocondrial puede lesionar a cualquier célula del organismo; sin embargo todas las mitocondrias de las neuronas se forman en el soma y deben ser transportadas a los nódulos de Ranvier y a la terminación sináptica por

transporte axoplásmico. Teniendo en cuenta que la lesión mitocondrial crónica conlleva una insuficiencia de ATP y que el transporte axoplásmico de las mitocondrias es un proceso altamente dependiente de ATP (Siegel y col, 1999), llega a producirse un círculo vicioso (Fig 1): disfunción mitocondrial – reducción de ATP – afectación del transporte axoplásmico de mitocondrias - más reducción de ATP, que finalmente provoca una claudicación mitocondrial, con la consiguiente muerte neuronal. Sadun (1998, 2002) plantea que las fibras más afectadas por este proceso incluirían aquellas con demandas energéticas más elevadas: las de disparo más frecuente, las más finas, los sistemas de transporte más largos, y aquellas con poca mielina o sin mielina, que son por lo tanto metabólicamente más ineficientes. Las fibras nerviosas que reúnen estas características son las fibras del haz papilomacular del nervio óptico, así como los nervios periféricos largos y sensitivos, que son precisamente las fibras más afectadas en la NE.

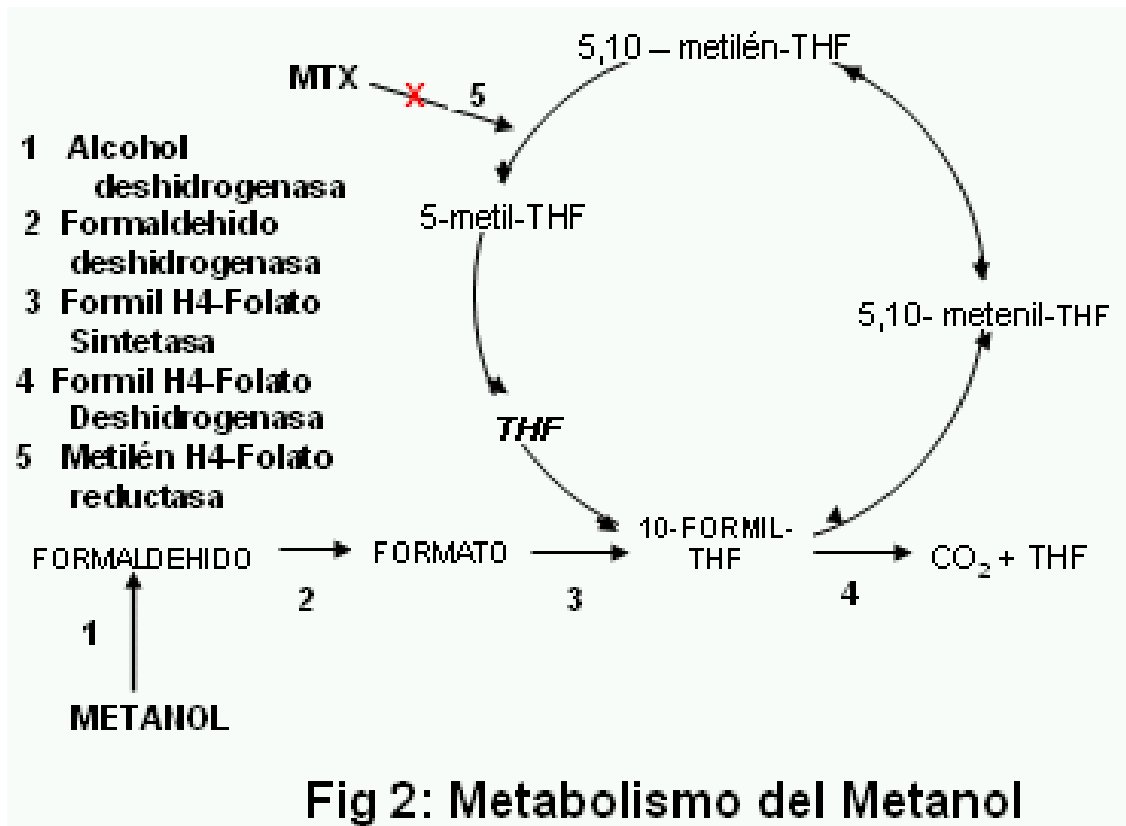
2.2 Intoxicación por metanol.

El metanol es una neurotoxina cuya ingestión tiene consecuencias muy graves para el humano (McKellar y col, 1997, Meyer y col, 2000, Barceloux y col 2002). La susceptibilidad incrementada a la intoxicación por metanol del sistema nervioso central y específicamente del sistema visual es muy bien conocida (Wallace y col, 1997; Sadun, 1998). Las características clínicas de la intoxicación aguda por metanol han sido minuciosamente detalladas e incluyen acidemia fórmica, acidosis metabólica, toxicidad visual, coma y en casos extremos hasta la muerte (Ingemansson, 1984). Las estructuras más sensibles a los efectos tóxicos del metanol son el nervio óptico y los ganglios basales. La lesión fundamental ocurre a nivel del nervio óptico retrolaminar, con hinchamiento intra-axonal y destrucción de organelos (Ingemansson, 1984; Albin, 2000; Feany y col, 2001). En casos de intoxicación severa, se puede presentar además necrosis del putamen y de la sustancia blanca subcortical, que pueden ser hemorrágicas, así como lesiones hiperintensas en el núcleo caudado, hipotálamo, putamen y sustancia blanca subcortical (Albin, 2000; Feany y col, 2001).

Existe muy poca información disponible acerca de la toxicidad por exposición crónica al metanol, aunque se ha planteado que la sintomatología es cualitativamente similar, pero menos severa que la inducida por la exposición aguda (Kayet y Naus, 1990): cefalea, mareos, náuseas y visión borrosa. También se han reportado casos de polineuropatía axonal (Hageman y col, 1999) y recientemente se reportó el desarrollo de parkinsonismo en un individuo joven después de una exposición prolongada a vapores de metanol en el laboratorio (Finkelstein y Vardi, 2002).

Hay que tener en cuenta que fisiológicamente existe una cantidad de metanol en la sangre (1-2 mg/l) que deriva de la dieta, de procesos metabólicos naturales y de la exposición al mismo en el medio ambiente. Se puede encontrar metanol y/o formiato en diversos alimentos: frutas y vegetales frescos y enlatados, jugos (principalmente de naranja, toronja y tomate), bebidas fermentadas, alimentos endulzados con aspartame, frijoles, lentejas, miel y café tostado, entre otros. Además el formiato se puede producir como un producto colateral de algunas vías metabólicas de degradación, como las de la histidina y el triptófano (WHO, 1997).

En los mamíferos el metanol es metabolizado a formaldehído en el hígado, y por pasos oxidativos subsecuentes se forman ácido fórmico y dióxido de carbono (Fig 2), a través de una vía dependiente del tetrahidrofolato (THF) (Eells y col, 1983; Aziz y col, 2002). Se ha identificado al ácido fórmico como el metabolito responsable de los efectos tóxicos del metanol, el cual inhibe a la citocromo oxidasa, uniéndose al hierro hem, e interfiere así directamente con el transporte de electrones en la cadena respiratoria (Eells y col, 1996; Wallace y col, 1997). Existe evidencia de que el ácido fórmico inhibe la función mitocondrial en la retina y aumenta el estrés oxidativo (Sadun, 1998). Esto se ha podido corroborar con la demostración de que la fotobioestimulación con radiación monocromática roja, que estimula la actividad de la citocromo oxidasa, protege a la retina contra los efectos tóxicos del formiato derivado del metanol (Eells y col, 2003). La acción citotóxica del metanol se ejerce de manera diferenciada sobre los fotorreceptores, con una recuperación parcial de las respuestas dominadas



por los bastones y ninguna recuperación sobre las respuestas mediadas por conos UV (Seme y col, 2001). No obstante, la susceptibilidad a la intoxicación por metanol es muy variable en los humanos, y aun más entre las diferentes especies de animales, dependiendo principalmente de la eficacia del ciclo de un carbono dependiente de folato. Los humanos y los primates no humanos son muy susceptibles a los efectos tóxicos del metanol, mientras que los roedores, conejos y perros, entre otras especies, no lo son (Dorman y col, 1994; Eells y col, 1983, 1991). Dos mecanismos han sido considerados para explicar la baja oxidación del formiato en especies susceptibles a la intoxicación por metanol: niveles hepáticos más bajos de THF y capacidad reducida de la 10-formil-THF deshidrogenasa (Johlin y col, 1989; Martinasevic y col, 1996; Cook y col, 2001).

Existe información abundante acerca de los mecanismos patogénicos de la intoxicación aguda por metanol en humanos (Ingemanson, 1984; Martinasevic y col, 1996; Meyer y col, 2000) y en modelos animales (Eells y col, 1991; Dorman y col, 1994; Lee y col, 1994; Eells y col, 1996; Seme y col, 1999; 2001,

Hayasaka y col, 2001). Para esto último se han utilizado modelos en especies no primates, en los cuales se ha inhibido la oxidación del formato, provocando una deficiencia de folatos. Los animales tratados con metanol a altas dosis, una vez inhibido el metabolismo del THF, acumulan formato a concentraciones tóxicas y desarrollan un síndrome análogo al envenenamiento por metanol en humanos (Eells, 1991; Lee y col, 1994), con acidemia fórmica, acidosis metabólica y toxicidad visual. Esto se ha logrado con la administración de dietas deficientes en folatos (Lee y col, 1994, Dorman y col, 1994; Sadun, 1998) o con el empleo de sustancias químicas que interfieren con la regeneración del THF: óxido nitroso (Eells y col, 1991; Eells y col, 1996; Seme y col, 1999) o metotrexate (MTX) (Makar y Tephly, 1977; Barford y col, 1980; Black y Tephly, 1983, Schalinske y Steele, 1996). La exposición de los animales a la inhalación de dosis subanestésicas de óxido nitroso, produce una inhibición irreversible de la enzima metionina sintasa, catalizadora de una reacción enzimática clave para la síntesis de THF y como consecuencia, una reducción significativa de la concentración de THF (Eells y col, 1983, 2000a). El MTX, un agente quimioterapéutico, es un análogo del dihidrofolato, que se une a la dihidrofolato reductasa, inhibiendo así su actividad enzimática (Kremer y col, 1986), con la consiguiente disminución de los niveles de THF (Kremer y col, 1986; Fiskerstrand y col, 1997; Endresen y Husby, 2001).

Los estudios electrofisiológicos en estos modelos animales han arrojado fundamentalmente: 1) disminución del potencial evocado cortical por flash (PECF), lo cual indica una interrupción de la conducción neuronal a lo largo de la vía visual primaria (Eells, 1991) y 2) disminución de la amplitud de la onda "b" del electroretinograma (ERG). La onda "b" del ERG es generada por la despolarización de las células gliales de Muller y refleja la actividad sináptica a nivel de las células bipolares. Esta onda es extremadamente sensible a condiciones que interfieren con el metabolismo energético retiniano (Wallace y col, 1997). En ratas juveniles se han encontrado efectos similares sobre la función retiniana (Plaziac y col, 2003).

Las mediciones bioquímicas demuestran una reducción significativa de la actividad de la citocromo oxidasa y de las concentraciones de ATP en la retina y cerebro de ratas intoxicadas con metanol, sin afectación de la actividad de la enzima a nivel hepático, renal ni cardíaco (Eells y col, 1995).

Por otro lado, los estudios morfológicos combinados con histoquímica de la citocromo oxidasa ha revelado edema retiniano generalizado, vacuolización de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario, hinchamiento de mitocondrias y reducción de la actividad de la citocromo oxidasa en las mitocondrias de los fotorreceptores (Eells y col, 1995).

A diferencia de la intoxicación aguda por metanol, los efectos de la exposición subcrónica o crónica a bajos niveles de metanol han sido poco estudiados y los resultados han sido muy controvertidos (Lee y col, 1994; Poon y col, 1994; Sadun, 1998). En 1987 la New Energy Development Organization (WHO, 1997) reportó que monos expuestos a 3000 ppm de metanol (21 hrs/día durante 20 días) no mostraron cambios histopatológicos en la retina, nervio óptico y núcleo geniculado lateral. Andrews y col (1987) no observaron alteraciones histológicas en retina y nervio óptico de ratas y monos cynomolgus expuestos a la inhalación de metanol (500 – 1500 ppm), 6 horas/día durante 4 semanas. Sin embargo, Ingemansson (1983) describió cambios en el electroretinograma (ERG) de monos tratados crónicamente con metanol.

Por su acción selectiva a nivel de la maquinaria energética mitocondrial, la administración de metanol ha sido utilizado experimentalmente como un modelo de la neuropatía óptica epidémica (Sadun, 1998; Eells, 2000a). Sadun en 1998 desarrolló un modelo de intoxicación crónica en ratas con deficiencia de folatos (0.8 g/Kg de metanol durante 10 días) y encontró en los estudios histológicos del nervio óptico, degeneración axonal, vacuolización, zonas de edema y alteraciones a nivel de las mitocondrias.

Los hallazgos anteriormente mencionadas indican que el formato actúa como una toxina mitocondrial con selectividad para la retina, nervio óptico y cerebro, y sugieren que las acciones neurotóxicas del formato pueden ser debidas a diferencias específicas de los tejidos relacionadas con los mecanismos de

transporte mitocondrial o con el metabolismo mitocondrial (Eells y col, 1995; Seme y col, 2001). Los mecanismos a través de los cuales la insuficiencia mitocondrial puede conducir a la muerte neuronal selectiva fueron expuestos en el acápite 2.1.

2.3 Barrera hematoencefálica y composición proteica del líquido cefalorraquídeo.

El concepto de una barrera que limitaba el intercambio entre la sangre y el cerebro fue planteado por Ehrlich en 1885. Existen las barreras sangre-cerebro y sangre-LCR; sin embargo, el término barrera hematoencefálica (BHE) comprende la consideración de múltiples factores que controlan los intercambios bidireccionales que ocurren a nivel de las interfases de membrana entre sangre, cerebro y LCR (Fishman, 1992).

La BHE y el LCR sirven como un sistema para preservar la homeostasis del SNC, facilitando tanto la entrada de metabolitos necesarios, como la eliminación o exclusión de metabolitos tóxicos o innecesarios. Se considera que la BHE está compuesta de múltiples interfases dinámicas de membrana que son vitales para la función cerebral. Es un sistema para proteger al cerebro de los cambios en la composición de metabolitos y toxinas en la sangre, que pudieran resultar perjudiciales, afectando el metabolismo y función neuronal (Fishman, 1992; Siegel y col, 1999).

La barrera sangre-cerebro está localizada a nivel de las células endoteliales de los capilares cerebrales y sus propiedades de barrera están dadas por: 1) las células endoteliales de estos capilares, a diferencia de las de otros órganos periféricos, tienen una baja velocidad de transcitosis y por lo tanto, el tráfico transcelular de solutos es muy limitado; 2) la entrada de moléculas esenciales al SNC es mediada a través de transporte específico y moléculas transportadoras; 3) el espacio paracelular entre células endoteliales adyacentes está casi completamente sellado, debido a la presencia de complejos de unión célula-célula (uniones estrechas), localizados en la región apical de las membranas plasmáticas laterales que impiden el paso de macromoléculas (Fishman, 1992; Gloor y col, 2001). Sin embargo, a nivel de la barrera sangre – LCR, los

capilares que la forman están fenestrados y la barrera está formada por las células epiteliales de los plexos coroideos y de la membrana aracnoidea, interconectadas por uniones estrechas (Siegel y col, 1999).

La BHE tiene características específicas de permeabilidad con respecto a diferentes solutos. Así, el peso molecular (PM) y sobre todo, el volumen molecular hidrodinámico, influyen grandemente en que una molécula pase en mayor o menor cantidad (Siegel y col, 1999). La exclusión relativa de las grandes moléculas del LCR se ilustra bien con la relación 1:200 de la concentración de albúmina en LCR normal y sangre (Saunders y col, 1999a; 1999b).

Entran más lentamente al cerebro y LCR aquellos compuestos hidrosolubles y polares debido a su gran dificultad para atravesar membranas lipídicas en ausencia de un transportador específico de membrana, como los demostrados para la glucosa y los aminoácidos. Se han identificado sistemas de transporte altamente específicos en los capilares cerebrales para metabolitos que son esenciales para el funcionamiento normal del cerebro: azúcares, varios ácidos orgánicos, aminoácidos ácidos, básicos, neutros, y beta-aminoácidos, colina y precursores de los ácidos nucleicos (Fishman, 1992; Siegel y col, 1999).

Las proteínas policatiónicas y lectinas atraviesan la BHE por un proceso inespecífico (transcitosis mediada por absorción), por el cual éstas se absorben a la membrana del endotelio capilar basado en la carga o afinidad para los residuos de carbohidratos de las glicoproteínas de la membrana (Siegel y col, 1999).

Desde hace años la combinación de estudios inmunoquímicos y electroforéticos del suero y LCR han sido utilizados para la evaluación del estado funcional de la BHE y la síntesis intratecal de inmunoglobulinas en diferentes enfermedades neurológicas (Link, 1976; Ebers y Paty, 1980; Papadopoulos y col, 1984, Burcet y col, 2000; Seyfert y col, 2002).

El incremento de la permeabilidad de la BHE, determinado por la relación albúmina LCR/suero (índice Q), es aceptado como un indicador del estado funcional de la BHE (Tibbling y col, 1977). Debido a que la albúmina del LCR se origina exclusivamente de la sangre, el incremento de su concentración siempre

tiene que ser consecuencia de una disfunción de la barrera (Reiber y Peter, 2001). Hay varias fuentes menores de proteínas del LCR que se pueden hacer mayores bajo circunstancias patológicas, por ejemplo, los ganglios de las raíces dorsales y las raíces ventrales. El paso de proteínas a través de la BHE en estas áreas particulares ocurre de una manera relativamente libre, pero en circunstancias patológicas, como es el caso del síndrome de Guillain Barré, esta barrera se puede hacer aún más permeable, y el nivel de proteínas totales en el LCR lumbar puede elevarse significativamente (Thompson, 1988; Hartung, 1998). La ruptura de la BHE es un hallazgo relativamente frecuente en otras enfermedades neurológicas: meningoencefalitis, enfermedad cerebrovascular, polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante (CIDP: siglas en inglés), esclerosis múltiple (EM) en brote (Thompson, 1988; Fishman, 1992; Nieborj y col, 1992; Reiber y Peter, 2001).

El análisis de inmunoglobulinas, de proteínas específicas y la citología del LCR pueden brindar información valiosa para el diagnóstico de diversas enfermedades neurológicas, especialmente en aquellas donde se sospecha una etiología infecciosa o autoinmune (Link, 1976; Cepok y col, 2001; Nobile-Orazio y Carpo, 2001; Scarpini y col, 2002). La detección de bandas oligoclonales en el LCR, sin haber presencia de las mismas en el suero, indica la síntesis local de inmunoglobulinas (Link, 1976; Fishman, 1992). No obstante, la presencia de bandas oligoclonales no es específica de una determinada entidad neurológica y han sido identificadas en el LCR de pacientes con diferentes enfermedades infecciosas o inflamatorias: (EM), encefalitis diseminada aguda, síndrome de Guillain Barré, panencefalitis esclerosante subaguda, panencefalitis progresiva por rubéola y encefalitis viral aguda (Link, 1976; Ebers y Paty, 1980; Strony y col, 1982; Kostulas, 1985). Es un hallazgo muy frecuente en las enfermedades desmielinizantes y constituyó hasta hace apenas dos años, uno de los criterios para el diagnóstico de la EM definida (Poser, 1998). La presencia de bandas oligoclonales en pacientes con neuritis óptica retrobulbar ha sido descrita, así como su posible relación con la aparición posterior de EM (Cole y col, 1998; Pokroy y col, 2001). No obstante, ocasionalmente pueden ser detectadas en

pacientes con enfermedades neurológicas que no clasifican entre las anteriormente mencionadas: ictus isquémico, polineuropatías, demencias, tumores y lesiones estructurales del SNC (Strony y col, 1982; Kostulas, 1985; Cohen y col, 2000).

2.4 Los aminoácidos en el sistema nervioso

Los aminoácidos son constituyentes esenciales del sistema nervioso y su destino metabólico se resume en 3 vías fundamentales: 1) incorporación a proteínas; 2) conversión en compuestos mensajeros, tales como neurotransmisores y hormonas y 3) oxidación para formar dióxido de carbono, agua y amonio. La neuroquímica de los aminoácidos en el sistema nervioso normal y patológico es de particular interés debido al importante rol de estos compuestos en la neurotransmisión, metabolismo y osmorregulación (Siegel y col, 1999).

En las enfermedades nutricionales se le ha dado mucha relevancia al conocimiento del estado de la composición aminoacídica, ya que independientemente de la importancia metabólica y estructural de todos los aminoácidos, hay un grupo de aminoácidos esenciales que no pueden ser sintetizados por el organismo y que tienen que ser aportados obligatoriamente en la dieta (triptófano, fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, treonina, lisina y metionina) (Reeds, 2000). El aporte insuficiente de estos componentes puede traer consecuencias no sólo para el funcionamiento del organismo como un todo, sino que puede afectar directamente el funcionamiento del sistema nervioso (Zigmond y col, 1998).

La carencia de aminoácidos esenciales y la baja ingestión de energía incrementan el catabolismo de proteínas hícticas y favorecen la pérdida de peso corporal. Además, se afectan entre otras, las reacciones de metilación que intervienen en la síntesis de mielina, la detoxificación del cianuro, y la baja ingestión del aminoácido triptófano y de piridoxina, compromete la síntesis de niacina (Siegel y col, 1999).

En aquellas enfermedades donde hay un profundo déficit en el aporte proteico y calórico (Kwashiorkor y Marasmo), se han reportado afectaciones en las concentraciones de aminoácidos esenciales (Lima y Jaffé, 1998; Jaffé y col, 1998). Osuntokun y col (1968) observaron alteraciones en el contenido de aminoácidos azufrados en la neuropatía atáxica en Nigeria, con ausencia o disminución de metionina y cisteína. En las ambliopías nutricionales, dentro de las cuales puede incluirse la ambliopía tabaco-alcohólica, se le ha dado mucha importancia al papel de los aminoácidos azufrados en los mecanismos de destoxificación del cianuro, elemento central en la fisiopatología de este proceso. Se ha sugerido que en esta entidad la intoxicación se produce por una rápida absorción del cianuro del cigarro a través del tracto gastrointestinal y de los pulmones, coincidiendo con un estado deficitario nutricional que lleva a niveles sistémicos bajos de vitamina B12, ácido fólico, piridoxina y aminoácidos azufrados, todos los cuales participan en el proceso de destoxificación del cianuro a tiocianato. Esta reacción es mediada por una transferasa de azufre (rodanasa) que convierte el tiosulfato en tiocianato y sulfito. Los aminoácidos azufrados - cistina, cisteína y metionina – proveen el azufre para estas reacciones (Walsh y Hoyt, 1982; Román, 1994). En la epidemia de neuropatía en Cuba, Porrata y col (1995) reportaron una ingestión de aminoácidos esenciales por debajo del 70% de las cantidades recomendadas en un estudio de casos y controles, al aplicar una encuesta semicuantitativa de frecuencia de consumo mediante entrevista individual directa.

Los aminoácidos tienen un papel preponderante como neurotransmisores o precursores de neurotransmisores en el SNC, incluyendo la retina y el nervio óptico (Siegel y col, 1999; Kalloniatis y Tomisich, 1999). La fenilalanina, leucina, tirosina, isoleucina, triptófano, metionina y L-DOPA pueden entrar al cerebro tan rápidamente como la glucosa. Estos aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados en el cerebro y por lo tanto deben proveerse por la degradación de proteínas y la dieta. Algunos son precursores de neurotransmisores en el cerebro como es el caso de la tirosina (precursor de las catecolaminas) y triptófano (precursor de las indolaminas) (Fishman, 1992). El glutamato, ácido γ -

aminobutírico (GABA) y glicina son los principales aminoácidos con función neurotransmisora, los dos primeros fundamentalmente en el cerebro y el último a nivel del tallo cerebral y la médula espinal. Otros aminoácidos como el aspartato y la taurina han sido propuestos como neurotransmisores, pero su función principal pudiera ser como precursores y en la osmorregulación (Siegel y col, 1999).

La codificación de la información sensorial a nivel de la retina se produce por vía de las interacciones neuronales que utilizan los 3 aminoácidos neurotransmisores dominantes: glutamato, GABA y glicina. El glutamato es el neurotransmisor de la vía retiniana directa: fotorreceptores – células bipolares – células ganglionares, mientras que las interneuronas o vías laterales (células amacrinas, horizontales e interplexiformes) utilizan fundamentalmente GABA o glicina, además de dopamina, serotonina y acetilcolina (Kalloniatis y Tomisich, 1999). Además, otros aminoácidos, entre los cuales están el aspartato, ácido homocisteico y taurina han sido identificados en la retina, donde tienen una función neuroactiva, pero no se les ha atribuido el *estatus* de neurotransmisores (Sun y Crossly, 2000). En la retina, la compleja interrelación entre los aminoácidos involucra además a las células de Müller, que constituyen las células gliales retinianas y tienen una función muy importante en el metabolismo y reciclamiento de los aminoácidos neurotransmisores (Kalloniatis y Tomisich, 1999).

Las células gliales y las neuronas en la retina y otras partes del SNC mantienen bajos los niveles extracelulares de glutamato, a través de un sistema de captura de alta afinidad. La remoción rápida del glutamato y neurotransmisores relacionados del espacio sináptico por este sistema contribuye a : a) la terminación de la señal excitatoria, b) el mantenimiento de los niveles extracelulares de glutamato por debajo de aquellos capaces de inducir daño excitotóxico y 3) reciclamiento del neurotransmisor por la vía del ciclo de la glutamina (Siegel y col, 1999; Cotman y col, 2000).

El glutamato, reconocido como el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC, activa los receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos

(Kretschmer y col, 2002). La liberación incrementada de glutamato y la disminución de su captura dan lugar a una elevación del glutamato extracelular que produce una activación excesiva de sus receptores, con la consiguiente muerte neuronal. Este concepto, denominado excitotoxicidad por Olney en 1972 (citado en Siegel y col, 1999), se produce por sobreestimulación de los receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA Y KA), lo cual da lugar a la entrada de cantidades letales de Ca^{2+} , con lo que se activan las vías citotóxicas intracelulares. En condiciones fisiológicas, la presencia de glutamato en la sinapsis es regulada por transportadores activos en las neuronas y glías. La evidencia acumulada sugiere que el glutamato está involucrado no sólo en la transmisión sináptica rápida, sino también en la plasticidad y en las funciones cognitivas superiores (Cotman y col, 2000). La excitotoxicidad participa en los mecanismos responsables de la muerte neuronal en diversas enfermedades neurológicas (Jiménez-Jiménez y col, 1998; Gucuyener y col, 1999; Skvortsova y col, 1999, Stover y Unterberg, 2000; Spreux-Varoquax y col, 2002; Tzschentke, 2002).

El GABA y la glicina son los principales neurotransmisores inhibitorios en el SNC. De hecho, el GABA y el glutamato son los que regulan de una forma general la excitabilidad en el SNC, en su interrelación como neurotransmisores inhibitorio y excitatorio respectivamente. La glicina, además de su función como neurotransmisor inhibitorio a nivel del tallo cerebral y médula espinal, también está presente en el cerebro anterior, donde actúa como un coagonista de los receptores NMDA. En este último contexto la glicina promueve las acciones del glutamato, de manera que en el SNC tiene tanto funciones inhibitorias como excitatorias (Paul, 2000).

Es indispensable destacar el papel de la taurina, un beta-aminoácido que no forma parte de proteínas, y que constituye uno de los aminoácidos más abundantes del organismo. Se encuentra libre en concentraciones milimolares en los tejidos animales, particularmente en aquellos que son excitables, ricos en membranas y que generan oxidantes: sistema nervioso central, retina, corazón y músculo esquelético, entre otros (Huxtable, 1989; Lombardini, 1992). Se sabe

que tiene importantes funciones como osmorregulador, antioxidante, destoxicante, neuromodulador, en la regulación de la excitabilidad eléctrica de la membrana celular, en la solubilización del colesterol y como sustrato en la conjugación de los ácidos biliares (Huxtable, 1989; Koyama y col, 1992; Pasantes-Morales y col, 1999; Keys y Zimmerman, 1999; Guérin y col, 2001; Militante y Lombardini, 2002).

La taurina es sintetizada a partir de metionina y cisteína, en presencia de la vitamina B₆. Se encuentra prácticamente ausente en las plantas, por lo que la fuente principal en la alimentación proviene de las carnes y productos animales (Huxtable, 1989).

En casi todos los mamíferos, la taurina es un aminoácido no esencial, sin embargo, en el gato es esencial y en el hombre y primates no humanos es condicionalmente esencial (Huxtable, 1989; Gaull, 1989). La ausencia en la dieta de un aminoácido condicionalmente esencial no produce una enfermedad deficitaria de inmediato, pero a la larga puede llegar a producir afectaciones. Niños y adultos humanos que recibían una nutrición parenteral libre de taurina durante un tiempo prolongado, mostraron reducciones significativas de la taurina en plasma, orina y células sanguíneas, en algunos casos acompañado de alteraciones oftalmoscópicas y electroretinográficas, que podían revertirse con la suplementación de taurina (y col, 1996). Actualmente se ha llegado a reconocer a la taurina como un nutriente importante y a veces esencial, por lo que es añadida a la mayoría de las fórmulas infantiles sintéticas y soluciones parenterales pediátricas (Gaull, 1989).

La taurina juega una importante función trófica en el sistema nervioso central y especialmente en la retina (donde es el aminoácido más abundante) y el nervio óptico (Lima y col, 1992; 1999; Lake, 1988). Durante los últimos 20 años se ha establecido claramente que la taurina juega un papel preponderante en el mantenimiento de la integridad de la retina y en la viabilidad de los fotorreceptores (Huxtable, 1989; Lima, 1999; Militante y Lombardini, 2002). El déficit de taurina en la dieta de los gatos da lugar a la disminución de la concentración de taurina en la retina, seguida de alteraciones en el electroretinograma (ERG), degeneración de

los fotorreceptores y finalmente ceguera (Militante y Lombardini, 2002). Debido a los efectos neurotróficos de la taurina y a su capacidad antioxidante, neuromoduladora y osmorreguladora (Huxtable, 1989), ha sido utilizada con frecuencia como suplemento y aminoácido protector en diferentes condiciones (Fukuyama y Ochiai, 1982; Kendler, 1989; Birdsall, 1998; Stapleton y col, 1998).

Para estudiar los efectos deletéreos de la deficiencia de taurina en el sistema visual y en el cerebro, se han utilizado animales deprivados nutricionalmente o farmacológicamente de este aminoácido. En el gato, el déficit se logra con efectividad utilizando dietas libres de taurina (Militante y Lombardini, 2002), pero en otras especies, como los roedores, no se alcanza una disminución de los niveles de taurina en la retina (Lake y de Marte, 1988). Por este motivo se han empleado antagonistas del transporte de taurina, específicamente β -alanina (β -Ala) y guanidinoetano sulfonato (GES) (Pasantes-Morales y col, 1983; Lake y De Marte, 1988; Sturman y Messing, 1996). Después de provocar la disminución de taurina en diferentes especies de mamíferos, se han descrito lesiones morfológicas y funcionales de la retina (Pasantes-Morales y col, 1983; Lu y col, 1996). En la rata el tratamiento con β -Ala o GES ha producido daño de la capa de fotorreceptores, pérdida de los núcleos celulares y del contenido de las terminaciones sinápticas, muerte celular y alteraciones electroretinográficas (revisado en Militante y Lombardini, 2002).

3.1 INVESTIGACIONES EN PACIENTES:

3.1.1 Pacientes y controles para el estudio de proteínas del LCR:

Se estudiaron 205 pacientes con el diagnóstico de NOE con o sin otro tipo de manifestación lesional del sistema nervioso central o periférico, que acudieron a la consulta de oftalmología del Hospital Provincial “Abel Santamaría” de Pinar del Río durante el período epidémico (1992 – 1993). Se incluyeron pacientes de 15 y más años de edad con diferentes tiempos de evolución, sin enfermedad ocular ni general previa que influyera en la visión. El grupo estaba constituido por 161 hombres (78.5%) y 44 mujeres (21.5%), con una edad promedio de 47.0 ± 11.3 años (15 – 77 años). El 94.1% de los pacientes eran fumadores y el 56.6% ingerían bebidas alcohólicas en mayor o menor grado.

Los criterios de definición de caso fueron los siguientes (Llanos, 1993; Santiesteban, 1997):

1. Paciente con déficit visual bilateral, de aparición en días o semanas, tanto para cerca como para lejos, aún con corrección máxima.
2. Pérdida o confusión de la visión a color, al menos en 3 láminas de las 21 en el test de Ishihara, edición 1992.
3. Escotoma relativo o absoluto en el área central o cecocentral del campo visual.
4. Fondo de ojo (FO) normal, hiperémico o con palidez papilar temporal.

A todos los pacientes se les realizó:

- a) Fondo de ojo
- b) Evaluación de los reflejos pupilares
- c) Agudeza visual (AV) con corrección.

El defecto de la AV se clasificó como severo cuando la visión era de 0,1 o menor, moderado entre 0,2 a 0,7 y leve entre 0,8 a 1 (González Marrero, 1994).

- d) Visión a color (VC) por el test de Ishihara de 38 láminas, edición 1992.

Los defectos de VC se clasificaron como severo cuando dejaron de ver correctamente 15 o más láminas; moderado, entre 8 y 14 láminas y leve, entre 3 y 7 láminas (González Marrero, 1994).

e) Estudio de campo visual (CV) con pantalla tangente negra a 1 metro de distancia usando estímulos blancos, rojos y verdes, en busca de escotomas relativos o absolutos para cada ojo.

f) Valoración neurológica

El grado de daño neurológico asociado a la NOE se expresó de acuerdo a lo establecido en González Marrero (1994):

Leve: Todo paciente con síntomas subjetivos de polineuropatía (motor, sensitivo o disautonómico) y/o nistagmos aislados.

Moderado: Además de lo anterior, una o más de las siguientes: disminución de cualquiera de las modalidades de la sensibilidad, sobre todo distal. Hiporreflexia o hiperreflexia osteotendinosa.

Severo: Ausencia demostrada al examen de cualquiera de las modalidades de la sensibilidad, sobre todo distal. Arreflexia o hiperreflexia osteotendinosa (+3) con reflejos patológicos. Dificultad para la marcha por ataxia o compromiso de la fuerza muscular. Atrofia o hipotrofia muscular. Hipoacusia sensorineural relacionada con la NOE de cualquier grado.

Los 205 pacientes estudiados se agruparon de acuerdo a la forma clínica de presentación en:

- forma óptica pura: 80 pacientes (39%).
- forma mixta (forma óptica con afectación neurológica periférica y/o central): 125 pacientes (61%).

Se conformó un grupo control seleccionado durante el tiempo de la epidemia, equiparado por edad, sexo y composición socio-económica con los pacientes, el cual estaba constituido por 89 sujetos sin antecedentes de enfermedades neurológicas ni oftalmológicas, que iban a ser sometidos a cirugía ortopédica con anestesia raquídea. Este grupo estaba formado por 64

hombres (71.9%) y 25 mujeres (28.1%), con una edad promedio de 44.4 ± 9.6 años (22 – 74 años).

3.1.2 Pacientes y controles para el estudio de aminoácidos:

El patrón de aminoácidos del LCR durante la epidemia se estudió en una muestra de 16 pacientes (12 hombres y 4 mujeres) de los pacientes de Pinar del Río descritos anteriormente, cuyos LCRs se encontraban almacenados a -70°C en el banco de LCR del INN. Ocho pacientes tenían la forma óptica de la enfermedad y 8 la forma mixta. La edad media de los mismos fue de 45.6 ± 10.0 años (27 – 64 años). Se determinaron también los aminoácidos en suero y LCR de 12 pacientes con NOE de Ciudad de la Habana (9 hombres y 3 mujeres), con una edad media de 43.8 ± 8.0 años (30 – 56 años), que hicieron su debut clínico durante el período endémico (1995 – 1997) y que fueron diagnosticados en el INN de acuerdo a los criterios clínicos descritos en el acápite 3.1. De acuerdo a la forma clínica de presentación, los pacientes se agruparon en: forma óptica, 4 pacientes (33.3 %) y forma mixta, 8 pacientes (66.7%).

Para el LCR se constituyó un grupo control de 20 individuos (13 hombres y 7 mujeres) seleccionados al azar del banco de LCR congelado a -70°C en el INN correspondiente a los controles del período epidémico descritos en el acápite 3.1. Estos eran pacientes sin enfermedad neurológica ni psiquiátrica, que iban a ser sometidos a anestesia raquídea para cirugía ortopédica, con una edad media de 45.0 ± 6.3 años (33 – 60 años). El grupo control para los aminoácidos séricos estuvo constituido por 19 sujetos sanos de Ciudad de la Habana (13 hombres y 6 mujeres), equiparado por edad, sexo y composición socio-económica con los pacientes del período endémico y con una edad media de 44.5 ± 9.2 años (14 – 62 años).

3.1.3 Procedimientos para la obtención de las muestras de suero y LCR:

En todos los casos, después de 8 – 12 horas de ayuno, 12 horas de reposo en cama y previo consentimiento informado, se obtuvieron 4 ml de LCR mediante punción lumbar no traumática, entre las 8:00 am y las 12:00 m. Paralelamente, se extrajeron 5 ml de sangre por punción venosa en un tubo

seco. La sangre y el LCR fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron congelados a -70°C hasta el momento de su procesamiento para el estudio proteico en el Instituto de Neurología y Neurocirugía (INN).

Para la determinación de aminoácidos, otras alícuotas de suero y LCR fueron desproteinizadas con ácido sulfosalicílico 20% (50 μl para 300 μl de muestra) y centrifugadas a 35 000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes se congelaron a -70°C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Neuroquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en Caracas.

3.1.4 Reactivos utilizados:

Para la realización de las técnicas analíticas que se emplearon para las determinaciones bioquímicas en humanos y en animales de experimentación se adquirieron los siguientes reactivos de las firmas:

SIGMA: agarosa tipo I, TEMED, persulfato de amonio, Azul Brillante de Coomassie R-250, patrones de aminoácidos, ácido sulfosalicílico, aldehído orto-ftálico, mercaptoetanol, fosfato de sodio, borato de potasio, sulfato de zinc, formato de sodio, fosfato de potasio, formato deshidrogenasa (FDH), diaforasa, resarzurina y todos de calidad analítica.

Merck: tartrato de sodio, sulfato cúprico, hidróxido de sodio, acrilamida, N'N'-metilén bisacrilamida, metanol, ácido acético glacial, todos de calidad analítica y metanol, tetrahidrofurano y acetonitrilo de calidad HPLC.

BDH: Reactivo de Fohlin-Ciocalteau, TRIS, glicina, Azul de Bromofenol, todos de calidad analítica.

Behring: estándares de albúmina humana estabilizada e IgG, suero antialbúmina y anti-IgG humanas (cadena H) y suero control Norpartigen.

La calidad del agua utilizada fue de $0.1 - 0.3 \mu\text{s} \times \text{cm}^{-1}$.

3.1.5. Técnicas analíticas:

Todas las técnicas analíticas se realizaron siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio.

A) Estudio proteico del LCR

Determinación de proteínas totales:

Se realizó la determinación de proteínas totales (PT) en el LCR por la técnica espectrofotométrica de Lowry (1953). El LCR se diluyó 1:10 y se midió la absorbancia a 720 nm. El cálculo de las concentraciones de PT se realizó contra una curva de calibración con albúmina bovina (Fracción V) y se expresaron en mg/dl. El coeficiente de variación (CV) intraensayo fue 3.8% y el interensayo, 6.3%.

Electroforesis del LCR en gel de poliacrilamida:

El fraccionamiento de las proteínas del LCR se llevó a cabo por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 7.5%, según la técnica descrita por Ornstein y Davies (Smith, 1968). La corrida electroforética se realizó en tubos de 70 x 7 mm, aplicando una corriente de 2.5 mAmp x tubo. En ambas cámaras electroforéticas se utilizó solución tampón de corrida Tris – Glicina, pH 8.3 y como marcador de la misma se empleó Azul de Bromofenol. La tinción de las bandas proteicas se realizó sumergiendo los geles hasta el día siguiente en Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0.25%, disuelto en metanol - ácido acético - agua (5:1:5). La decoloración de los geles se llevó a cabo con una mezcla de metanol - ácido acético - agua (5:1:5) hasta la total visualización de las bandas.

Teniendo en cuenta los parámetros propuestos por Evans (1966) y Takeoka y col (1980), el patrón electroforético obtenido se evaluó cualitativamente y se clasificó como: 1) normal; 2) incremento de la permeabilidad de la BHE; 3) presencia de bandas oligoclonales; 4) incremento de la permeabilidad de la BHE y presencia de bandas oligoclonales ó 5) patrón degenerativo. En la Fig 3 se muestra el fraccionamiento electroforético de las proteínas de un LCR con su suero correspondiente:

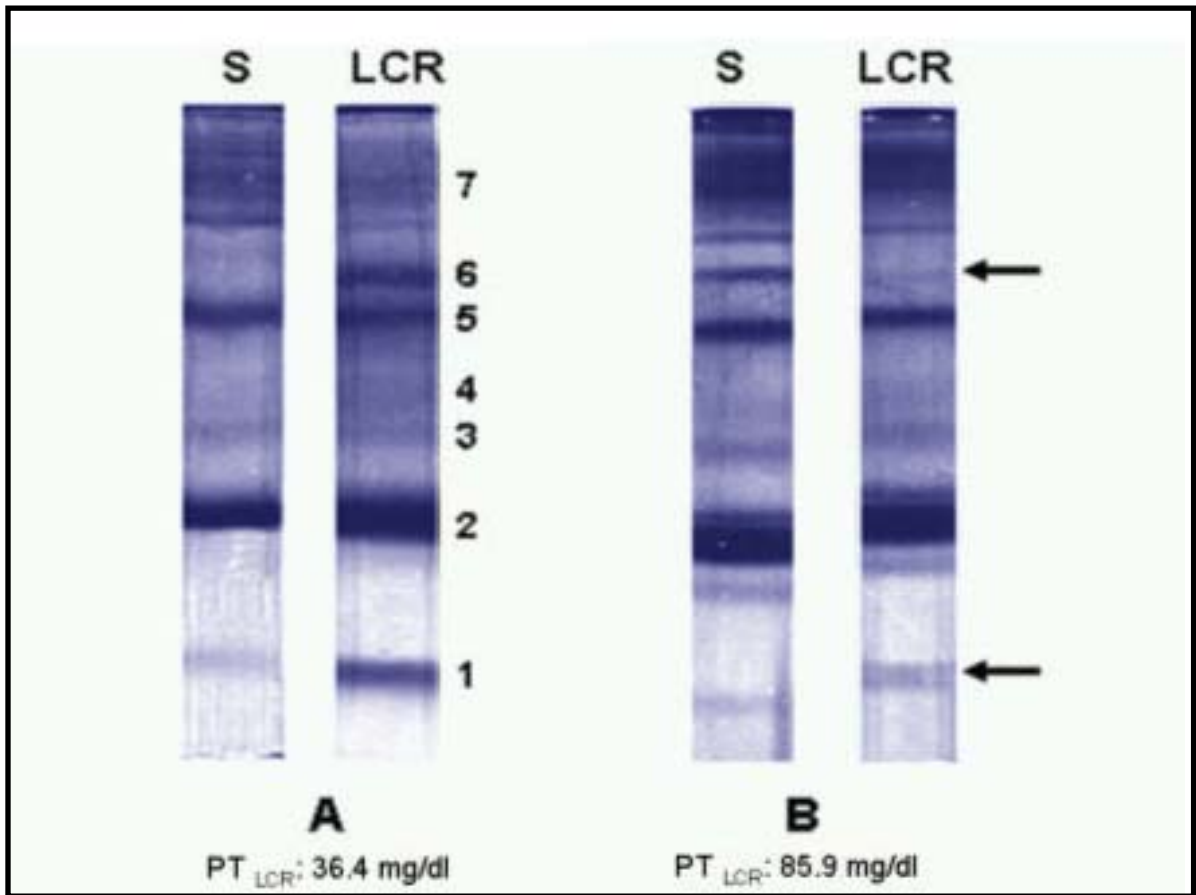


Fig 3: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% de suero y LCR: Normal (A) y en un sujeto con daño de la BHE (B). Las fracciones proteicas fundamentales del LCR corresponden con: 1) prealbúmina (transtirretina), 2) albúmina, 3) alfa-1 globulina, 4) alfa-2 globulina, 5) beta-1 globulina (transferrina), 6) beta-2 globulina (proteína tau) y 7) ganma-globulina. Se señala con flechas la disminución de las fracciones prealbúmina y beta-2 globulina que caracterizan el daño de la BHE.

Cuantificación de albúmina e IgG en suero y LCR

Para la cuantificación de albúmina e IgG tanto en suero como en LCR se utilizó la técnica de inmunodifusión radial simple descrita por Mancini (1965), que se basa en la difusión del antígeno a través de un soporte de agarosa que contiene el antisuero específico. En la preparación de las placas para la cuantificación de albúmina en el suero y en el LCR se utilizó el antisuero de albúmina humana (100 μ L en 7 mL de agarosa al 1.5%). Las muestras de LCR se aplicaron puras y el suero sanguíneo a una dilución de 1:200. Los halos de precipitación de albúmina e IgG de suero se midieron a las 48 h por observación

visual directa y los de albúmina e IgG de LCR a las 72 h por observación visual después del revelado de la placa con ácido tánico al 1%. Las concentraciones del antígeno (albúmina e IgG) de cada muestra se calcularon a partir de una curva patrón y se expresaron en mg/dl. Los CV intraensayo para la albúmina de suero, albúmina de LCR, IgG de suero e IgG de LCR fueron 3.2, 3.9, 4.1 y 4.6% respectivamente y los CV interensayo fueron 4.7, 5.2, 5.8 y 6.2% respectivamente.

Cálculo de los índices:

Una vez calculadas las concentraciones de albúmina e IgG en el suero sanguíneo y en el LCR se realizaron los cálculos correspondientes para el análisis del estado funcional de la BHE y la síntesis intratecal de IgG (Tibbling y col, 1977) mediante las siguientes fórmulas:

1) Síntesis intratecal de IgG (índice IgG):

$$\text{Índice IgG} = (\text{IgG LCR}/\text{IgG suero})/(\text{Alb LCR}/\text{Alb suero})$$

El índice IgG se considera como normal hasta 0.7. Valores por encima de 0.7, indican la existencia de síntesis intratecal de IgG.

2) Estado funcional de la BHE (Índice Q):

$$\text{Índice Q} = (\text{albúmina LCR}/\text{albúmina suero}) \times 1000$$

Este cociente permite evaluar el estado funcional de la BHE, y los valores normales son dependientes de la edad, según lo establecido en la tabla de normalidad para Q (Tibbling y col, 1977):

17 - 30 años: 1,7 – 5,7

31 - 40 “ : 1,8 – 6,2

41 - 50 “ : 2,0 – 7,2

51 - 60 “ : 2,1 – 8,9

61 - 77 “ : 2,2 – 9,0

B) Análisis de aminoácidos en suero y LCR.

Los aminoácidos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorescente, según la técnica descrita en Lima y col (1989) y Jaffe y col (1998). El sistema estaba constituido por una bomba Modelo 2150,

un controlador de gradiente modelo 2152 (LKB, Suecia) y un detector de fluorescencia Shimadzu RF-551. Se llevó a cabo la derivatización previa de los aminoácidos, añadiendo 100 ul de una mezcla de 25 mg de aldehído orto-ftálico, 500 ul de metanol, 25 ul de mercaptoetanol (1 g/ml), y 4.5 ml de tampón borato de potasio 0.4 M, pH 7.4. Las soluciones utilizadas para crear el gradiente de la fase móvil fueron: Solución A, fosfato de sodio 50 mM, pH 6.3; tetrahidrofurano 0.3% y acetonitrilo 5%; Solución B, acetonitrilo. El gradiente principal en porcentaje de Solución B fue el siguiente: 0 - 25 min 15%; 25 - 45 min 20%; 45 - 60 min 30%; 60 - 70 min 50%; 70 - 75 min 90%; 75 - 78 min 95%; 78 - 80 min 0%. Se utilizó una velocidad de flujo de 1 ml/min y la detección se hizo a 340/450 nm (excitación/emisión). Las soluciones matrices de aminoácidos (1 mg/ml) se prepararon en HCl 0.5N y se almacenaron a -20 °C.

Con este sistema se cuantificaron 20 aminoácidos en el suero y LCR: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), histidina (His), glutamina (Gln), treonina (Thr), arginina (Arg), glicina (Gly), alanina (Ala), taurina (Tau), ácido γ -aminobutírico (GABA), tirosina (Tyr), metionina (Met), triptofano (Trp), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), leucina (Leu), ornitina (Orn) y lisina (Lys). En los anexos 3 y 4 se muestran los cromatogramas correspondientes. Las concentraciones de los aminoácidos se calcularon según el método del estándar externo y se expresaron en nmoles/ml. El CV intraensayo de los aminoácidos estuvo entre 2.4 y 4.8% y el CV interensayo entre 3.6 y 7.3%.

Se calcularon las relaciones entre las concentraciones de aminoácidos en suero y LCR en pacientes y controles, así como las relaciones de algunos aminoácidos entre sí en ambos fluidos biológicos.

3.2 EXPERIMENTOS EN ANIMALES:

3.2.1 Biomodelos:

Los estudios en animales se condujeron en el laboratorio de Neuroquímica del IVIC en Caracas. Se utilizó como biomodelo la rata macho Sprague Dawley (S-D), con un peso corporal al comienzo del experimento entre 100 y 150g. Se realizaron dos protocolos experimentales para la evaluación de los efectos de la administración crónica de metanol, uno suplementando la dieta con taurina al

2% y otro provocando un déficit de taurina con la administración de β -Ala al 5%. Las ratas se colocaron en jaulas individuales y se mantuvieron bajo un ciclo de iluminación-oscuridad de 12 horas, con acceso libre a comida y agua. Los animales provenían del vivario del IVIC y se manipularon de acuerdo a las condiciones estipuladas en la Declaración de Helsinki.

a) Administración crónica de metanol con suplemento de taurina.

Cuarenta ratas S-D fueron divididas en 6 grupos de tratamiento según se resume en la Tabla 1. Cuatro grupos de animales recibieron agua *ad libitum* durante una semana. En la segunda semana los grupos 1 (Control) y 2 (MeOH) recibieron solución salina subcutánea (sc), mientras que los grupos 3 (MTX) y 4 (MTX-MeOH) recibieron MTX sc (0.2 mg/kg/día). En la tercera semana se redujo el MTX a 0.1 mg/kg/día y se administró metanol 20% (2g/kg/día) intraperitonealmente (ip) a los grupos 2 y 4, mientras que los grupos 1 y 3 recibieron volúmenes equivalentes de salina ip. Los tratamientos se continuaron así hasta el final de la cuarta semana. Los dos grupos experimentales restantes, 5 (Tau) y 6 (Tau-MTX-MeOH) recibieron taurina 2% en lugar de agua de beber y se sometieron al mismo esquema de tratamiento que los grupos 1 y 4 respectivamente. No murió ningún animal debido a los tratamientos aplicados. Todos los animales se pesaron semanalmente y al terminar el experimento fueron sacrificados con guillotina.

TABLA # 1: Protocolo del experimento de administración crónica de metanol en ratas con suplemento de taurina.

Grupos	n	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Control (1)	6	Agua a.l.	Agua a.l. S. Salina s.c.	Agua a.l. S. Salina s.c. S. Salina i.p.	Agua a.l. S. Salina s.c. S. Salina i.p.
MeOH (2)	6	Agua a.l.	Agua a.l. S. Salina s.c.	Agua a.l. S. Salina s.c. MeOH 2 g/Kg	Agua a.l. S. Salina s.c. MeOH 2 g/Kg
MTX (3)	7	Agua a.l.	Agua a.l. MTX 0.2 mg/Kg	Agua a.l. MTX 0.1 mg/Kg Salina i.p.	Agua a.l. MTX 0.1 mg/Kg Salina i.p.
MTX-MeOH (4)	8	Agua a.l.	Agua a.l. MTX 0.2 g/Kg	Agua a.l. MTX 0.1 mg/Kg MeOH 2 g/Kg	Agua a.l. MTX 0.1 mg/Kg MeOH 2 g/Kg
Tau (5)	6	Tau 2% a.l.	Tau 2% a.l. S. Salina s.c.	Tau 2% a.l. S. Salina s.c. S. Salina i.p.	Tau 2% a.l. S. Salina s.c. S. Salina i.p.
Tau-MTX-MeOH (6)	7	Tau 2% a.l.	Tau 2% a.l. MTX 0.2 mg/Kg	Tau 2% a.l. MTX 0.1 mg/Kg MeOH 2 g/Kg	Tau 2% a.l. MTX 0.1 mg/Kg MeOH 2 g/Kg

* Metanol: 2 g/kg/día i.p.

MeOH: metanol; MTX: metotrexate; Tau: Taurina 2%

b) Administración crónica de metanol y déficit de taurina.

Cuarenta y ocho ratas S-D fueron divididas en 8 grupos de tratamiento según se resume en la Tabla 2. Cinco grupos recibieron agua *ad libitum*, mientras que los otros tres recibieron β -alanina al 5% (β -Ala) en el agua de beber. Al finalizar la tercera semana, un grupo que tomaba agua (grupo 7) y otro que tomaba β -Ala (grupo 8) fueron sacrificados. En la cuarta semana los grupos 3 (MTX), 4 (MTX-MeOH) y 6 (β -Ala-MTX-MeOH) recibieron MTX sc (0.2 mg/kg/día), mientras que los grupos 1 (Control), 2 (MeOH) y 5 (β -Ala) recibieron salina sc. En la cuarta semana el MTX se redujo a 0.1 mg/kg y se administró MeOH ip (2 g/kg/día) a los grupos 2 (MeOH), 4 (MTX-MeOH) y 6 (β -Ala-MTX-MeOH), mientras que los grupos 1, 3 y 5 recibieron volúmenes equivalentes de salina ip. Este tratamiento se continuó hasta finalizar la sexta semana. Los grupos 5 (β -Ala) y 6 (β -Ala-MTX-MeOH) recibieron β -Ala al 5% *ad lib* en el agua

de beber durante las 6 semanas. Murieron dos animales durante el tratamiento, uno del grupo MeOH y otro del grupo β -Ala-MTX-MeOH. Todos los animales se pesaron semanalmente y al terminar el experimento fueron sacrificados por decapitación.

Tabla 2: Diseño del experimento de administración crónica de metanol en ratas con déficit de taurina.

Grupos	n	Semanas 1 - 3	Semana 4	Semanas 5 - 6
Control (1)	6	Agua (a.l.)	Agua (a.l.) S. Salina s.c.	Agua (a.l.) S. Salina s.c. S. Salina i.p.
MeOH (2)	6	Agua (a.l.)	Agua (a.l.) S. Salina s.c.	Agua (a.l.) S. Salina s.c. Metanol 2 g/Kg*
MTX (3)	6	Agua (a.l.)	Agua (a.l.) MTX 0.2 mg	Agua (a.l.) MTX 0.1 mg/Kg Salina i.p.
MTX-MeOH (4)	6	Agua (a.l.)	Agua (a.l.) MTX 0.2 mg	Agua (a.l.) MTX 0.1 mg/Kg Metanol 2 g/Kg*
β-Ala (5)	6	β -Alanina 5% (a.l.)	β -Alanina 5% (a.l.) S. Salina s.c.	β -Alanina 5% (a.l.) S. Salina s.c. S. Salina i.p.
β-Ala-MTX-MeOH (6)	6	β -Alanina 5% (a.l.)	β -Alanina 5% (a.l.) MTX 0.2 mg	β -Alanina 5% (a.l.) MTX 0.1 mg/Kg Metanol 2 g/Kg*
Control (7)	4	Agua (a.l.)	SACRIFICIO	
β-Ala (8)	5	β -Alanina 5% (a.l.)		

* Metanol: 2 g/kg/día i.p.

MeOH: metanol; MTX: metotrexate; β -Ala: β -alanina

3.2.2 Procedimientos para la obtención y preparación de sangre y tejidos.

Inmediatamente después de la eutanasia por guillotina, se colectaron 2 ml de sangre en un tubo heparinizado, de los cuales 1 ml fue congelado a -20°C , para la determinación de formato. El otro ml de sangre fue centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm para obtener plasma, el cual fue desproteínizado con ácido sulfosalicílico 20% (50 ul por cada 300 ul de plasma), centrifugado a 35 000 g durante 20 minutos y congelado a -70°C para el análisis de aminoácidos.

El cerebro y los ojos fueron extraídos rápidamente. La retina, nervio óptico, hipocampo y corteza posterior se disecaron sobre hielo y fueron congelados inmediatamente a -70°C para los estudios de aminoácidos. Una retina completa o dos nervios ópticos fueron homogeneizados en 300 μl de tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6.3, mientras que las cortezas e hipocampos fueron homogeneizadas en 2 ml del mismo tampón, y desproteinizadas con ácido sulfosalicílico 20% (50 μl por cada 300 μl de homogenizado). Estos fueron posteriormente centrifugados a 35 000 g durante 20 minutos y se tomaron los sobrenadantes para la determinación de aminoácidos.

3.2.3 Técnicas analíticas

A) Determinación de proteínas totales.

Se tomaron 20 μl de los homogeneizados de tejidos para la determinación de proteínas totales por el método de Lowry (1953), según la metodología explicada en el acápite 3.1.4 (A). Las concentraciones de proteínas se expresaron en mg/ml de homogeneizado.

B) Determinación de formato sanguíneo:

La determinación de la concentración de formato en sangre total se llevó a cabo con el empleo de la técnica espectrofluorimétrica descrita por Makar y Tephly (1982). El método se basa en la reacción del formato con la formato deshidrogenasa (1.2.1.2), acoplada a la reducción catalizada por diaforasa del colorante no fluorescente, resarzurin, a la sustancia fluorescente resorufin.

La sangre total previamente desproteinizada con $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5%, fue centrifugada a 35 000 g durante 20 minutos y el sobrenadante libre de proteínas fue utilizado para la determinación de formato. El análisis se llevó a cabo en dos pasos. En el primer paso, 0.1 ml del sobrenadante se mezclaron con 0.1 ml de una solución de NAD^+ 10 mM, 0.1 ml de tampón fosfato de potasio (pH 7.4, 20 mM) y 50 μl de solución de FDH (0.05 U de formato deshidrogenasa en 1 ml de tampón fosfato de potasio que contiene 1 mg de NAD^+). Esta mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos y en un segundo paso se añadieron 0.1 ml de diaforasa (4 U/ml), 50 μl de solución de resarzurin (0.2 mg/ml) y 0.5 ml de tampón fosfato

(pH 6.0, 200 mM). Los tubos se agitaron y se continuó la incubación por 5 minutos más a 37° C. Seguidamente los tubos se sumergieron en agua hirviendo durante 3 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 5 ml de agua destilada, se mezcló bien el contenido y se leyó en un espectrofluorímetro Aminco-Bowman a 565/590 nm. Se preparó una curva de calibración con formato de sodio (0.2 -2.5 ug/ml) y se calcularon a partir de la misma las concentraciones de formato en sangre, las cuales se expresaron en mmoles/L. El CV intraensayo fue 4.3% y el interensayo, 7.5%.

C) Análisis de aminoácidos:

Los aminoácidos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorescente según el método detallado en el acápite 3.1.4 (B). La corrida cromatográfica se detuvo después de la tirosina, ya que el interés fundamental estaba en los aminoácidos neuroactivos (Asp, Glu, Gly, GABA y Tau). Se determinaron 14 aminoácidos en plasma, retina, nervio óptico, corteza posterior e hipocampo: Asp, Glu, Asn, Ser, His, Gln, Gly, Thr, Arg, Ala, Htau, Tau, GABA y Tyr. En los anexos 5, 6 y 7 se muestran los cromatogramas correspondientes. El contenido de los aminoácidos se calculó según el método del estándar externo y se expresó la concentración en nmoles/mg de proteína para el tejido y en nmoles/ml para el plasma. El porcentaje de recobrado de los aminoácidos de los tejidos estuvo entre 89 y 95%.

El número de animales estudiados en plasma y tejidos nerviosos no siempre coincidió con lo que se refleja en la tabla del protocolo del experimento correspondiente por diferentes motivos: hemólisis o coagulación de la sangre, homogeneizado insuficiente por necesidad de repetición del análisis, rotulación no legible en el vial de congelación y en el caso de retina y nervio óptico, un animal de cada grupo se utilizó para los estudios histológicos.

3.2.4 Análisis estadístico:

Para la confección de las bases de dato se utilizó el programa Statistica para Windows (Statsoft, Inc, 2000) y para los cálculos estadísticos se consultó este programa y Sigarroa (1985). Se calcularon las medias y el error estándar de cada una de las variables cuantitativas. Para las comparaciones entre las medias de

dos grupos se empleó la prueba t de Student o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Se empleó el ANOVA o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para las comparaciones entre más de dos grupos. La prueba de Duncan se utilizó para las comparaciones de medias *pos hoc*. Para las comparaciones entre variables cualitativas se empleó la prueba Chi Cuadrado. Se utilizó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman para buscar asociación entre las concentraciones de aminoácidos en suero y LCR y las variables clínicas cuantitativas. Se trabajó con un nivel de significación menor de 0.05.

4.1 NEUROPATÍA ÓPTICA EPIDÉMICA.

4.1.1 Descripción clínica de los pacientes.

Las principales manifestaciones clínicas correspondieron al sistema nervioso y en la mayoría de los pacientes el déficit visual fue el motivo de consulta médica. Referían visión borrosa que se desarrollaba en días o semanas y que mejoraba algo en el crepúsculo. Excepcionalmente los pacientes refirieron de forma espontánea toma de la visión cromática, aunque en todos se comprobó este defecto al explorar con las tablas pseudocromáticas de Ishihara (Manual de la prueba de Ishihara, 1992). En la Tabla 3 se muestran las principales manifestaciones clínicas encontradas al examen físico.

Tabla 3: Principales hallazgos clínicos en los pacientes con neuropatía óptica epidémica.

Síntomas	N	%
Disminución de la agudeza visual	205	100.0
Afectación de la visión a color	205	100.0
Aumento de la mancha ciega	172	84.1
Fondo de ojo normal	127	62.0
Palidez papilar	53	25.7
Escotoma cecocentral	33	15.9
Escotoma central	8	3.9
Daño neurológico asociado	125	61.0
Acroparestesia	58	28.5
Debilidad de miembros inferiores	42	20.5
Disminución de la audición	26	12.7
Dolor y calambres en miembros inferiores	24	11.5
Nistagmo	16	7.8
Síntomas disautonómicos	16	7.8
Ataxia	5	2.4

Hay que destacar que la disminución de la agudeza visual fue leve en 4 pacientes (2.0%), moderada en 88 (42.9%) y severa en 113 (55.1%). La afectación de la visión a color fue leve en 6 pacientes (2.9%), moderada en 35 (17.1%) y severa en 164 (80.0%). Se observaron diversos grados de palidez papilar, la mayoría de tipo ligero y localización temporal.

Ochenta pacientes (39%) presentaron la forma óptica pura de la enfermedad y 125 presentó además daño neurológico asociado (61.0%). El daño neurológico fue ligero en 35 pacientes (28.0%), moderado en 49 (39.2%) y severo en 41 (32.8%). La acroparestesia y la debilidad en miembros inferiores, fueron los síntomas neurológicos más frecuentes, seguidos en orden de importancia del dolor en miembros inferiores, calambres en los pies y la disminución de la audición.

En la Fig 4 se muestra la distribución de los pacientes con NOE de acuerdo a los días de evolución en el momento de la toma de las muestras de sangre y LCR. Como se puede observar, la mayoría de los pacientes (81.5%) se encontraban entre los 16 y los 120 días de evolución de la enfermedad.

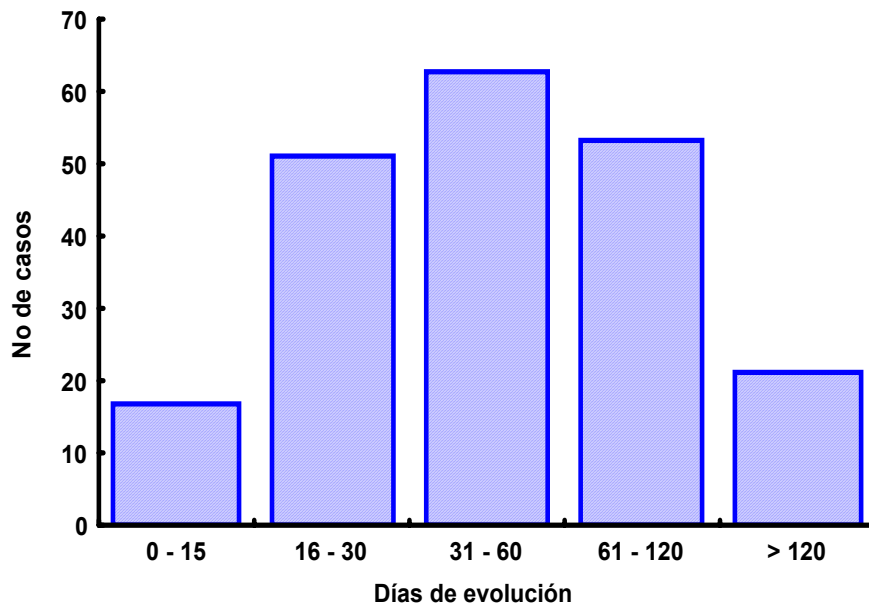


Fig 4: Días de evolución de la neuropatía óptica epidémica

4.1.2 Análisis de las proteínas del LCR en pacientes con neuropatía óptica epidémica.

Conjuntamente con el estudio proteico del LCR, se realizó el estudio celular, el cual arrojó conteos celulares normales en todos los pacientes (0-8 células).

El estudio cuantitativo del perfil proteico en suero y LCR de estos pacientes se muestra en la Tabla 4. Se observó un incremento altamente significativo de las concentraciones de PT, albúmina e IgG en el LCR y de albúmina sérica en los pacientes con NOE. No se detectaron diferencias en el contenido de las inmunoglobulinas séricas estudiadas ni en el índice que cuantifica la síntesis intratecal de IgG.

Tabla 4: Concentración de las variables bioquímicas en suero y LCR de pacientes con neuropatía óptica epidémica

Variables bioquímicas	Controles (n)	Pacientes NOE (n)	t	p
PT_{LCR} (mg/dl)	39.8 ± 1.2 (89)	48.7 ± 1.4 * (198)	4.015	0.00008
Alb_{LCR} (mg/dl)	19.0 ± 0.6 (68)	29.3 ± 1.3 * (71)	7.268	0.00000
IgG_{LCR} (mg/dl)	2.94 ± 0.15 (68)	4.21 ± 0.25 * (113)	3.787	0.0002
Índice IgG	0.466 ± 0.017 (68)	0.476 ± 0.020 (51)	0.392	ns
Alb_s (mg/dl)	3968.1 ± 78.4 (68)	4554.1 ± 95.0 * (52)	4.794	0.00005
IgG_s (mg/dl)	1342.9 ± 42.4 (68)	1347.5 ± 40.7 (102)	0.075	ns
IgA_s (mg/dl)	318.6 ± 28.3 (19)	296.4 ± 16.9 (65)	-0.636	ns

Los estudios electroforéticos del LCR arrojaron patrones diferenciales en controles y pacientes, los cuales se resumen en la Tabla 5. En ambos grupos predominó el patrón normal, aunque este fue significativamente más frecuente en el grupo control ($p < 0.001$). El daño de la BHE estuvo presente en la cuarta parte de los pacientes con NOE y el porcentaje de casos con la BHE dañada fue más elevado en los pacientes que en los controles ($p < 0.001$). En los controles

no se detectó la presencia de bandas oligoclonales, mientras que aparecieron en un 12.0% de los pacientes estudiados (si consideramos los que tienen bandas oligoclonales solas y aquellos en los que se detectó conjuntamente daño de BHE y bandas oligoclonales). El patrón degenerativo estuvo presente en aproximadamente el 1.0% de los controles y pacientes.

Tabla 5: Patrones electroforéticos del LCR en pacientes con NOE

Patrones electroforéticos	Controles (%) (n)	Pacientes NOE (%) (n)
Normal	94.9 % (56)	63.9% ** (117)
Daño de BHE	3.4% (2)	22,9% ** (42)
Bandas oligoclonales	0 (0)	9.3% * (17)
Daño BHE + B. Oligoclonales	0 (0%)	2.7% (5)
Degenerativo	1.7% (1)	1.1% (2)

Comparación de proporciones: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$
Entre paréntesis: número de pacientes

El análisis del estado funcional de la BHE se hizo empleando tanto los resultados de la electroforesis de proteínas del LCR, como el índice Q. El resumen de los mismos se puede observar en la Fig. 5, donde se ve que por ambos métodos hay un incremento significativo de la permeabilidad de la BHE ($p < 0.01$) en aproximadamente la cuarta parte de los pacientes con NOE.

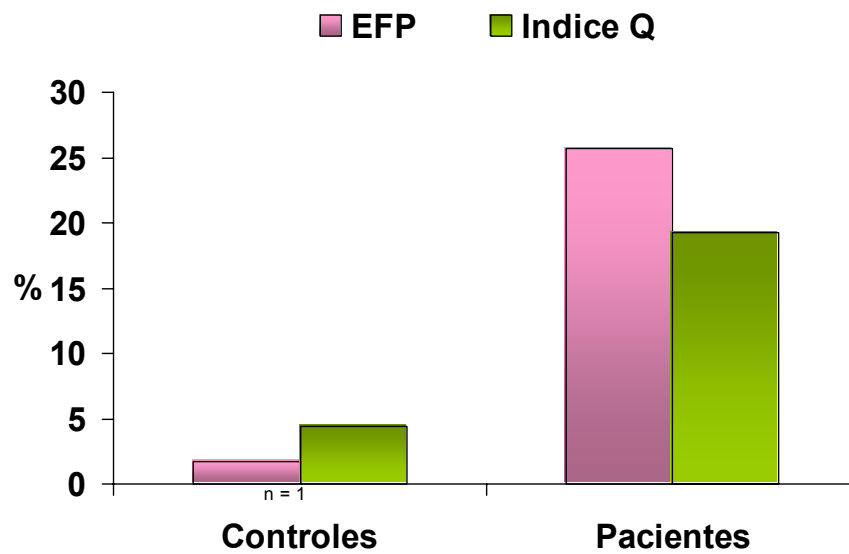


Fig 5: Daño de BHE en pacientes con neuropatía óptica epidémica
 * $p < 0.01$ (Prueba de comparación de proporciones)
 EFP: Electroforesis de proteínas

Al efectuar comparaciones de acuerdo al tipo de presentación clínica de la enfermedad (formas óptica y mixta), no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a las variables bioquímicas determinadas en suero y LCR, a los patrones electroforéticos del LCR, ni a los índices correspondientes con el estado funcional de la BHE y la síntesis intratecal de IgG (resultados no mostrados).

Se observó un mayor porcentaje de pacientes con incremento de la permeabilidad de la BHE entre los 16 y 120 días de evolución con respecto a los rangos extremos ($p < 0.05$); sin embargo, la presencia de bandas oligoclonales no estuvo relacionada con el tiempo de evolución (Fig 6).

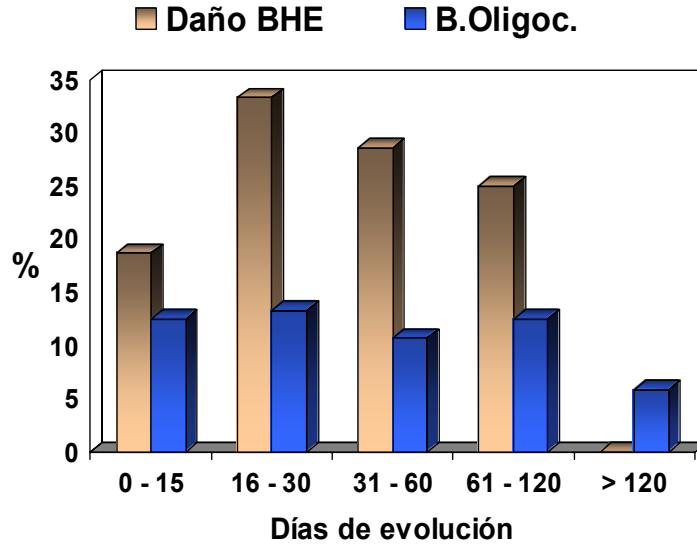


Fig 6: Daño de BHE y bandas oligoclonales según el tiempo de evolución de la enfermedad

Chi cuadrado: Daño BHE $p < 0.05$; B.Oligoc. ns

No se encontró asociación entre la severidad del daño oftalmológico (afectación de la agudeza visual y de la visión a color) y las variables bioquímicas estudiadas. Tampoco se encontró asociación con el estado funcional de la BHE ni con la síntesis intratecal de IgG.

Al distribuir a los pacientes de acuerdo al daño neurológico en dos grupos (Tabla 6): daño neurológico severo (DNS) y daño neurológico no severo (DNNS) (grupo que incluye a los pacientes con daño neurológico ligero y moderado más los pacientes sin alteraciones neurológicas) se pudo observar que en los pacientes con DNS había cifras significativamente más elevadas de PT en el LCR ($p < 0.05$) y de IgA en el suero ($p < 0.01$).

Tabla 6: Variables bioquímicas en suero y LCR y severidad del daño neurológico.

Variables bioquímicas	Daño Neurológico	
	DNS	DNNS
PT_{LCR} (mg/dl)	58.1 ± 4.9 * (22)	48.5 ± 1.8 (129)
Albúmina_{LCR} (mg/dl)	31.8 ± 3.1 (14)	28.7 ± 1.4 (57)
IgG_{LCR} (mg/dl)	5.09 ± 0.52 (18)	4.05 ± 0.27 (95)
Índice IgG	0.503 ± 0.046 (8)	0.471 ± 0.023 (43)
Albúmina_s (mg/dl)	4750.5 ± 241.5 (9)	4513.0 ± 103.4 (43)
IgG_s (mg/dl)	1490.6 ± 99.2 (12)	1328.4 ± 44.0 (90)
IgA_s (mg/dl)	425.8 ± 89.0 ** (7)	280.8 ± 14.7 (58)

Entre paréntesis: número de pacientes

DNS: Daño neurológico severo

DNNS: Daño neurológico no severo + sin daño neurológico

t de Student: * p < 0.05; ** p < 0.01

El análisis del estado funcional de la BHE según los resultados de la electroforesis del LCR y el índice Q (Fig 7) reveló un mayor porcentaje de pacientes con permeabilidad incrementada de la BHE en el grupo de pacientes con DNS (p < 0.05) con respecto a aquellos sin daño neurológico severo. Sin embargo, al analizar la presencia de bandas oligoclonales de acuerdo a la severidad del daño neurológico (Tabla 7), se observó una asociación significativa (p < 0.01) entre la presencia de bandas oligoclonales y el DNNS. Llama la atención que de los 21 pacientes que presentaron bandas oligoclonales, ninguno correspondía al grupo con daño neurológico severo.

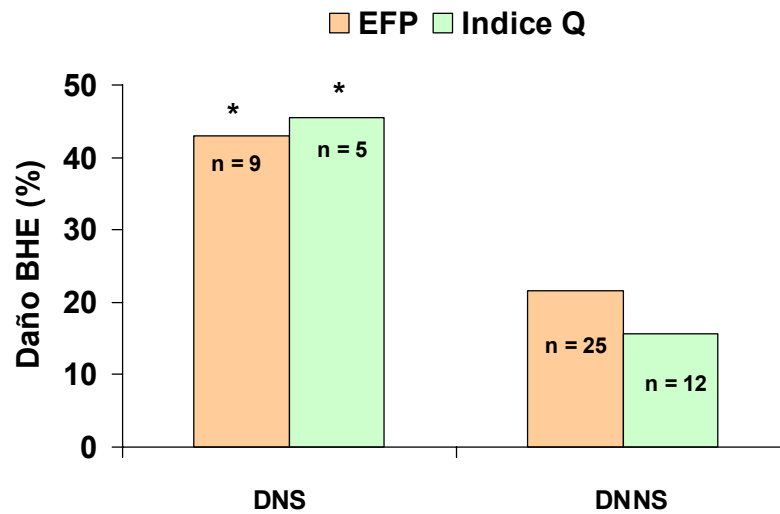


Fig 7: Severidad del daño neurológico e incremento de la permeabilidad de la BHE en pacientes con NOE
 DNS: Daño neurológico severo; DNNS: Daño neurológico no severo
 EFP: Electroforesis de proteínas Chi cuadrado: $p < 0.05$

Tabla 7: Presencia de bandas oligoclonales y severidad del daño neurológico

Presencia de bandas oligoclonales	Daño Neurológico	
	DNS	DNNS
Si	0	21
No	33	128
Total	33	149

$\chi^2 = 8.990, p = 0.0027$

DNS: Daño neurológico severo, DNNS: Daño neurológico no severo

El estudio del LCR que se realizó en los 12 pacientes estudiados durante el período endémico, arrojó resultados similares a los del período epidémico: elevación del valor medio de las PT (50.7 ± 5.1 mg/dl) con respecto al control (39.8 ± 1.2 mg/dl) e incremento de la permeabilidad de la BHE en 3 pacientes (33.3% de los casos).

3.1.3 Análisis de aminoácidos en suero y LCR de pacientes con neuropatía óptica epidémica y endémica.

Al comparar el patrón de aminoácidos séricos en los pacientes estudiados durante el período endémico con el grupo control, se observó una disminución significativa de Asp ($t = 2.246$, $p = 0.032$), Tau ($t=2.208$, $p = 0.035$) y Thr ($t = 2,237$, $p = 0.035$) (Tabla 8). No se encontraron diferencias significativas de las concentraciones séricas de los demás aminoácidos entre controles y pacientes.

TABLA 8: Concentración de aminoácidos en el suero de pacientes con Neuropatía Óptica Endémica

Aminoácidos (nmoles/ml)	Control (n=19)	Endemia (n=12)
Asp	33,1 ± 5,1	16,2 ± 4,9 *
Glu	114,2 ± 19,5	142,0 ± 59,4
Asn	69,2 ± 15,7	52,8 ± 7,9
Ser	100,4 ± 8,0	102,0 ± 12,8
His	93,3 ± 8,0	91,2 ± 11,0
Gln	810,1 ± 69,9	954,2 ± 131,5
Thr	290,2 ± 23,3	213,8 ± 23,6 *
Arg	124,3 ± 12,4	122,05 ± 24,8
Gly	266,0 ± 31,6	243,6 ± 50,8
Ala	377,2 ± 30,8	394,1 ± 31,5
Tau	118,9 ± 12,9	73,7 ± 15,9 *
Tyr	54,8 ± 6,3	50,5 ± 7,0
Val	207,2 ± 15,9	207,4 ± 21,6
Met	20,4 ± 2,9	19,3 ± 4,0
Trp	58,5 ± 5,6	52,5 ± 9,1
Ile	70,1 ± 5,0	75,6 ± 7,7
Phe	93,2 ± 7,8	82,1 ± 9,0
Leu	116,2 ± 11,3	107,8 ± 14,8
Orn	101,5 ± 11,3	135,1 ± 19,6
Lys	141,6 ± 16,4	191,6 ± 41,7

* $p < 0.05$ (t de Student)

Tampoco se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de los aminoácidos séricos al comparar los pacientes de acuerdo a la forma clínica de la enfermedad (óptica o mixta).

El cálculo del coeficiente de correlación de Spearman demostró una asociación significativa entre las concentraciones séricas de Arg, Tau, Trp y Phe con la agudeza visual ($r = 0.850$, $p = 0.002$, $r = 0.679$, $p = 0.031$, $r = 0.722$, $p = 0.018$ y $r = 0.709$, $p = 0.021$ respectivamente). No obstante, no se demostró correlación entre la visión a color y las concentraciones séricas de aminoácidos.

Las relaciones asp/tau y tau/val disminuyeron significativamente en el suero de los pacientes con respecto al control, mientras que la relación glu/tau aumentó (Fig 8).

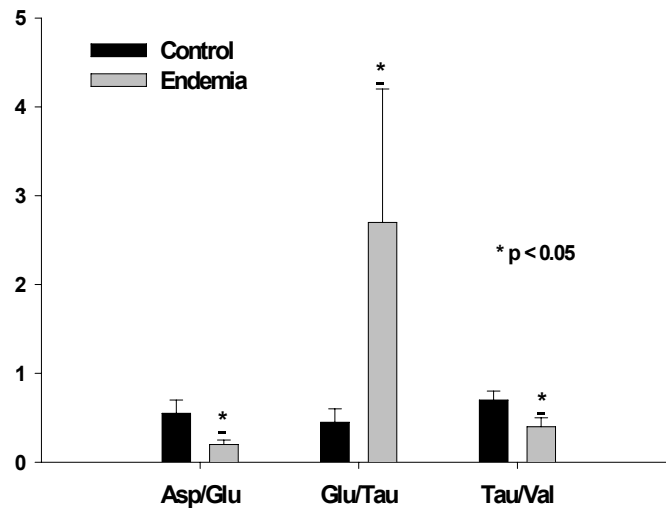


Fig 8: Relación de aminoácidos séricos en el período endémico

En el LCR (Tabla 9) se observó un incremento significativo de la concentración de Asp ($p < 0.01$) y Glu ($p < 0.05$), así como una disminución ($p < 0.05$) de Met con respecto al control durante el período epidémico; mientras que en el período endémico hubo incremento significativo de Glu ($p < 0.05$), Thr ($p < 0.01$) y Met ($p < 0.01$). Al comparar los resultados de los períodos epidémico y endémico entre si, se observaron niveles más elevados de Thr y Met en la endemia ($p < 0.01$) y de Gln en la epidemia ($p < 0.05$).

Por otro lado, en la epidemia se encontró una disminución significativa de Thr en el LCR de la forma mixta de NOE con respecto a la óptica ($Z = 2.205$, $p = 0.027$),

mientras que en la endemia hubo una disminución de metionina en la forma mixta ($Z = 2.066$, $p = 0.039$).

TABLA 9: Concentración de aminoácidos en el LCR de pacientes con Neuropatía Óptica Epidémica y Endémica.

Aminoácidos (nmoles/ml)	Control (n=20)	Epidemia (n=16)	Endemia (n=10)	ANOVA	
				F	p
Asp	3,0 ± 0,4	7,3 ± 1,4**	3,5 ± 0,5	6.642	0.003
Glu	4,5 ± 0,6	16,3 ± 5,8 *	36,7 ± 15,1*	3.299	0.049
Asn	9,8 ± 1,7	10,6 ± 1,5	9,3 ± 1,8	0.163	ns
Ser	26,3 ± 4,3	28,3 ± 3,8	25,8 ± 4,3	0.108	ns
His	16,0 ± 1,8	19,4 ± 2,7	17,6 ± 2,4	0.493	ns
Gln	385,9 ± 39,0	537,8 ± 59,6 +	379,6 ± 55,3	2.866	ns
Tre	10,2 ± 1,4	10,5 ± 1,7 ++	41,6 ± 16,7**	6.170	0.004
Arg	63,5 ± 11,4	31,9 ± 6,6	51,1 ± 14,8	2.413	ns
Gly	32,0 ± 5,6	32,2 ± 6,8	51,1 ± 13,6	1.423	ns
Ala	41,0 ± 7,9	36,5 ± 5,9	48,8 ± 10,5	0.631	ns
Tau	4,1 ± 0,5	5,6 ± 0,8	8,6 ± 3,8	1.193	ns
Tyr	17,4 ± 3,1	12,1 ± 3,0	16,3 ± 3,8	0.783	ns
GABA	13,0 ± 3,2	13,6 ± 2,3	13,4 ± 2,3	0.005	ns
Val	14,5 ± 2,8	24,4 ± 4,5	26,8 ± 8,4	1.323	ns
Met	14,4 ± 2,0	5,8 ± 1,3* ++	24,2 ± 4,0**	11.897	0.0001
Trp	8,7 ± 1,2	9,6 ± 1,4	14,2 ± 3,1	0.879	ns
Ile	9,5 ± 1,3	11,7 ± 1,5	18,4 ± 8,5	1.520	ns
Fen	9,7 ± 1,4	12,5 ± 2,4	21,7 ± 7,7	2.180	ns
Leu	19,2 ± 3,2	23,6 ± 4,0	27,5 ± 8,2	0.540	ns
Lis	27,5 ± 3,4	39,7 ± 4,8	27,1 ± 6,2	2.200	ns

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Prueba de Duncan vs Control)

+ $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$ (Prueba de Duncan: Epidemia vs Endemia)

No se observó correlación entre las concentraciones de aminoácidos en suero y LCR, ni entre los niveles de aminoácidos en el LCR y la severidad de los signos clínicos.

No se encontró asociación entre el estado funcional de la BHE y las concentraciones de aminoácidos en el LCR, excepto en el caso de la His, que presentó niveles más bajos en los pacientes con daño de la BHE ($Z = -2.085$, $p = 0.037$).

El cálculo de las relaciones de aminoácidos en el LCR demostró elevación de los índices Glu/Tau, Glu/Gly y GABA/Gly (Fig 9) en los pacientes estudiados en

el período epidémico ($p < 0.05$) con respecto al control y elevación de estos tres índices y de Asp/Tau, Glu/GABA, Glu/Val, Thr/Val, Tyr/Val, Thr/Tau y Met/Tau ($p < 0.05$) durante el período endémico (Fig 10).

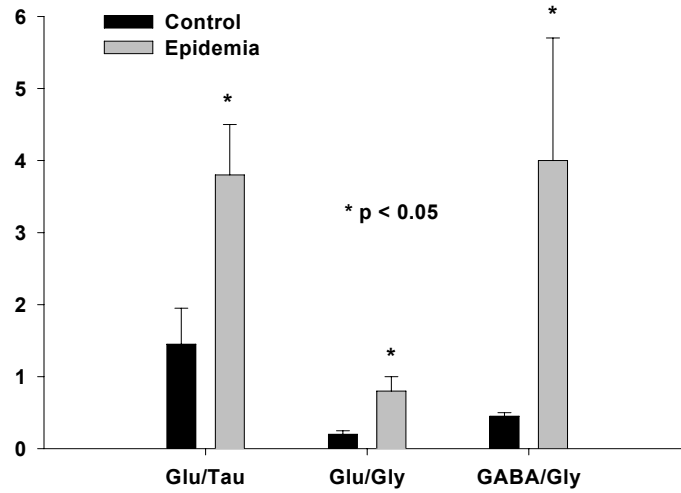


Fig 9: Relación de aminoácidos en LCR en período epidémico

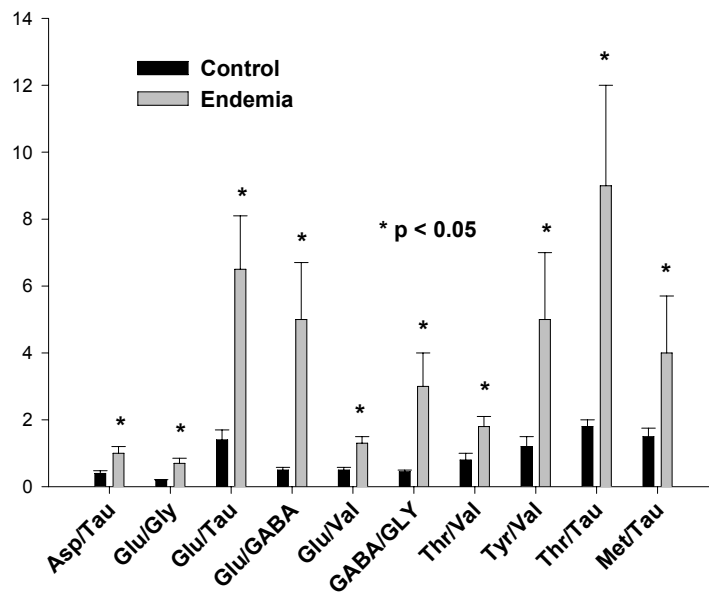


Fig 10: Relación de aminoácidos del LCR en el período endémico

4.2 ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE METANOL EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

4.2.1 Administración crónica de metanol en ratas y suplemento de Tau.

A) Niveles de formato en sangre de ratas tratadas con metanol

En la Fig. 11 se presentan las concentraciones de formato en sangre de los 6 grupos experimentales. La comparación *post-hoc* de las medias mediante la prueba de Duncan demostró un incremento significativo de las concentraciones de formato en sangre en las ratas tratadas con MeOH con respecto a los grupos Control, MTX y Tau ($p < 0.05$). El tratamiento con MTX-MeOH y Tau-MTX-MeOH

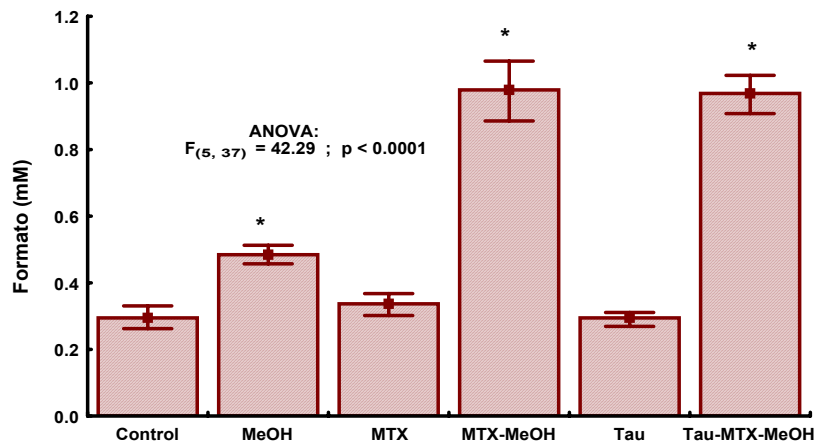


Fig 11: Concentración de formato sanguíneo en ratas tratadas con metanol
MeOH: Metanol; MTX: Metotrexate; Tau: Taurina 2%

produjo elevación de formato ($p < 0.0001$) con respecto a los restantes grupos (Control, MeOH, MTX y Tau). La administración de Tau al 2% en el agua de beber no tuvo ningún efecto sobre los niveles basales de formato, ni modificó el aumento producido por el MTX-MeOH.

En los animales que fueron tratados con MTX se observó un menor incremento de peso al finalizar el tratamiento (113.5 ± 5.4 g) con relación a los no tratados con MTX (143.0 ± 5.0 g), diferencia que resultó altamente significativa ($t = 3.950$, $p = 0.0004$) al aplicar la prueba t de Student.

B) Análisis de aminoácidos.

La administración de MTX-MeOH durante 2 semanas no produjo variaciones significativas en las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos estudiados, mientras que la adición de Tau 2% al agua de beber, produjo un incremento de las concentraciones plasmáticas de Tau e His. La adición de MTX-MeOH (grupo Tau-MTX-MeOH) no revirtió el incremento de Tau, pero sí el de His (Fig 12).

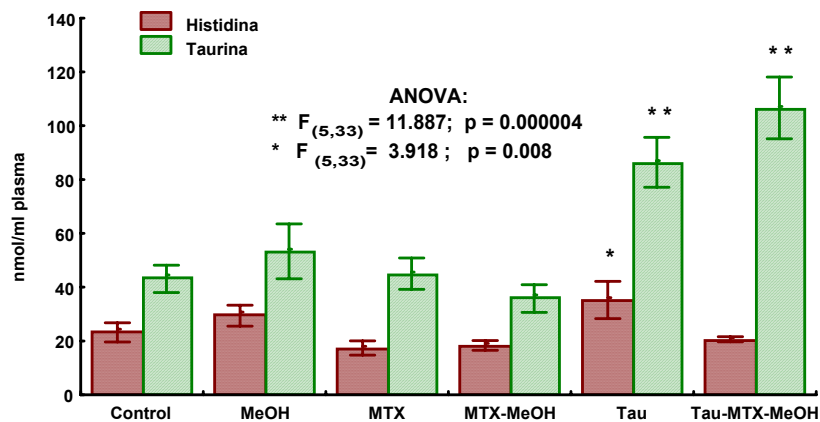


Fig 12: Concentración de taurina e histidina en plasma
MeOH: Metanol; MTX: Metotrexate; Tau: Taurina 2%

Aunque la administración de Tau 2% incrementó los niveles plasmáticos de Tau, no se detectó incremento de Tau a nivel tisular (retina, nervio óptico, hipocampo y corteza posterior).

En los Anexos 1 y 2 se presentan las tablas con las concentraciones de aminoácidos en retina y nervio óptico de los animales que fueron tratados con MeOH durante dos semanas. El ANOVA no arrojó diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los aminoácidos en retina, mientras que en nervio óptico se encontró una diferencia significativa ($F = 4.684$, $p = 0.005$) para el Asp. La comparación *post-hoc* de medias con la prueba de Duncan, demostró una elevación significativa ($p < 0.05$) del contenido de Asp en nervio óptico en los dos grupos tratados con MTX-MeOH (MTX-MeOH y Tau-MTX-MeOH) con respecto al control. Llamó la atención que con el método empleado no se pudo detectar

tirosina en retina, mientras que en nervio óptico se pudo cuantificar en todos los grupos. No se observó correlación entre los niveles de los diferentes aminoácidos en retina y nervio óptico.

En el hipocampo se observó un incremento en el contenido de Glu, Gln y Tau en todos los grupos donde se administró MeOH ($p < 0.05$), independientemente de que se adicionara MTX y/o Tau 2% (Tabla 10). Los niveles de Asp también se encontraron elevados en el hipocampo de las ratas tratadas con MeOH y MTX-MeOH ($p < 0.05$), no así en el grupo donde además se administró Tau al 2% (Tau-MTX-MeOH). Los demás aminoácidos estudiados no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

En la corteza posterior no se observó variación de los niveles de aminoácidos en ninguno de los grupos experimentales (datos no mostrados).

Tabla 10: Concentración de aminoácidos en el hipocampo de ratas de acuerdo al tratamiento

Grupos	n	Asp (nmol/mg prot)	Glu (nmol/mg prot)	Gln (nmol/mg prot)	Tau (nmol/mg prot)
Control	6	12,2 ± 2.7	42.8 ± 8.5	12.1 ± 1.6	23.1 ± 5.4
MeOH	6	36.9 ± 9.6 *	120.9 ± 26.8 *	67.5 ± 14.0 *	91.1 ± 18.7 *
MTX	7	26.6 ± 5.3	78.5 ± 9.6	43.3 ± 6.5	62.1 ± 13.2
MTX-MeOH	7	32.4 ± 6.5 *	90.2 ± 18.3 *	58.6 ± 16.7 *	70.7 ± 19.5 *
Tau	5	14.5 ± 3.0	47.2 ± 7.5	27.8 ± 2.4	43.1 ± 10.2
Tau-MTX-MeOH	7	24.6 ± 4.2	100.8 ± 14.5 *	61.4 ± 12.2 *	69.4 ± 10.6 *

MeOH: metanol; MTX: metotrexate; Tau: Tau 2%

ANOVA:

Asp: $F_{(5,38)} = 2.603$; $p = 0.043$

Glu: $F_{(5,38)} = 3.391$; $p = 0.014$

Gln: $F_{(5,38)} = 3.508$; $p = 0.012$

Tau: $F_{(5,38)} = 2.581$; $p = 0.045$

* Duncan: $p < 0.05$ vs Control

4.2.2 Administración crónica de metanol en animales con déficit de taurina.

a) Determinación de la concentración de formato en sangre.

En el presente experimento, la administración crónica de metanol en ratas produjo una elevación de los niveles de formato en sangre (similar al descrito en el acápite 4.2.1) en aquellos animales tratados con MTX-MeOH y β -ala-MTX-MeOH ($F_{[3, 17]} = 33.124$, $p = 0.00001$). La administración de β -ala al 5% no modificó los niveles basales de formato, ni el incremento producido por el MTX-MeOH.

Se observó un menor incremento de peso en los animales tratados con β -Ala al 5% con respecto a aquellos que recibieron agua corriente para beber: 186.8 ± 10.8 y 234.5 ± 5.9 g respectivamente ($t = 3.883$, $p = 0.003$).

b) Análisis de aminoácidos

Después de 6 semanas de tratamiento (Tabla 11), se observaron niveles significativamente más bajos de Tau plasmática (52.3% de la media del grupo control) en las ratas tratadas con β -Ala al 5% ($p < 0.05$). No se detectaron variaciones en las concentraciones de los demás aminoácidos en el plasma con la administración de β -Ala al 5% (no se muestran los datos). El peso de las ratas al final del experimento estuvo correlacionado significativamente con los niveles plasmáticos de Tau en el grupo tratado con β -Ala ($r = 0.822$, $p = 0.045$), pero no en el grupo control.

Tabla 11: Concentración de taurina en el plasma y tejidos neurales de ratas tratadas con β -alanina al 5% ($m \pm es$).

Tejidos	Tau ($\mu\text{mol/mg prot}$) 3 semanas		Tau ($\mu\text{mol/mg prot}$) 6 semanas	
	Control (n = 4)	β -Ala 5% (n = 5)	Control (n = 6)	β -Ala 5% (n = 6)
Plasma ($\mu\text{mol/L}$)	nd	nd	619.6 \pm 99.4	323.9 \pm 84.9*
Retina	196.3 \pm 39.1	155.1 \pm 20.8	265.0 \pm 62.2	295.3 \pm 36.7
Nervio óptico	86.6 \pm 12.0	59.6 \pm 11.6	138.5 \pm 21.2	119.8 \pm 49.5
Corteza posterior	nd	nd	28.2 \pm 1.5	21.0 \pm 1.2**
Hipocampo	27.4 \pm 0.6	18.2 \pm 0.4**	21.2 \pm 0.7	17.2 \pm 0.8**

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ con respecto al control (t de Student)

nd: no determinado

La administración sola de β -Ala al 5% no modificó la concentración de Tau (Tabla 11), ni de ninguno de los demás aminoácidos estudiados en la retina y nervio óptico con respecto al control, después de 3 y 6 semanas de tratamiento. No obstante, sí produjo una disminución significativa ($p < 0.01$) de la concentración de Tau en la corteza posterior a las 6 semanas de tratamiento (74.5% del valor medio del control) y en el hipocampo a las 3 y 6 semanas de tratamiento (68.6 y 81,1% respectivamente del valor medio del grupo control). No se observaron variaciones en las concentraciones de otros aminoácidos en corteza posterior e hipocampo con la administración de β -Ala al 5%.

Se observaron variaciones significativas de la concentración de Thr en la retina con los diferentes tratamientos (Fig 13), la cual se encontraba marcadamente elevada ($p < 0.05$) en aquellos animales que recibieron β -ala-MTX-MeOH ($p < 0.05$). La β -Ala al 5% o el MTX-MeOH, administrados independientemente, no modificaron los niveles retinianos de Thr. No se detectaron cambios en las concentraciones de los demás aminoácidos en la retina.

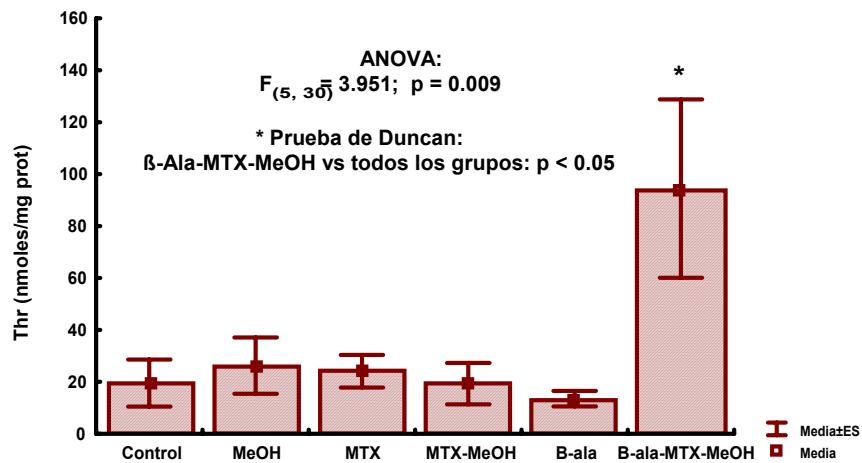


Fig 13: Concentración de treonina en la retina de ratas tratadas con β -alanina al 5% y metanol

El contenido de Asp fue significativamente más elevado ($p < 0.05$) en el nervio óptico de aquellos animales tratados con MTX-MeOH, independientemente de la administración de β -Ala al 5% (Fig. 14).

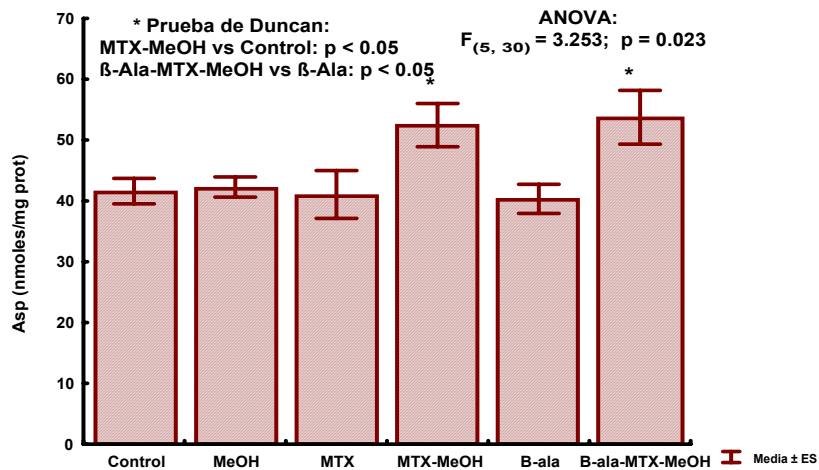


Fig. 14: Concentración de aspartato en el nervio óptico de ratas tratadas con β -alanina al 5% y metanol.

La combinación de β -ala-MTX-MeOH produjo un incremento significativo de la concentración de asparagina en el hipocampo, mientras que no se observó ningún efecto en los otros grupos de tratamiento (Fig. 15). No se detectaron variaciones en las concentraciones de los demás aminoácidos.

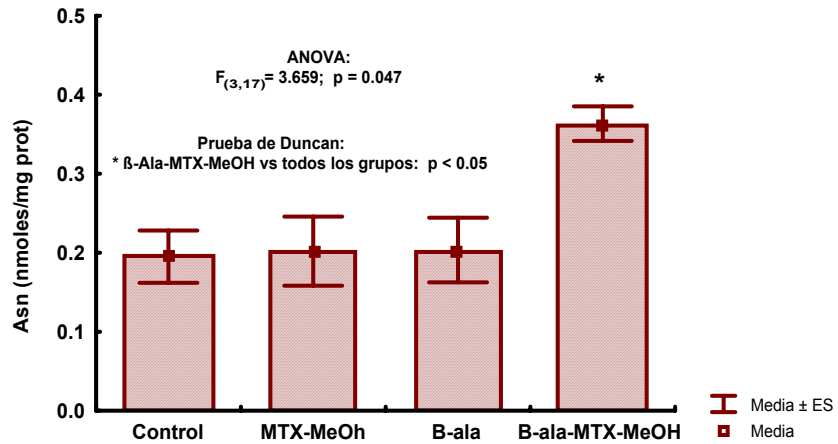


Fig 15: Concentración de asparagina en el hipocampo de ratas tratadas con β -alanina al 5% y metanol

V. DISCUSIÓN

5.1 NEUROPATÍA ÓPTICA EPIDÉMICA.

5.1.1 Estado funcional de la barrera hematoencefálica y composición de proteínas del LCR en pacientes con NOE.

La caracterización clínica de los pacientes incluidos en el presente trabajo (tanto los estudiados durante el período epidémico como el endémico) mostró un comportamiento muy similar a lo reportado por otros autores para esta enfermedad (Batista y Serrano, 1997; CNFIT, 1995; Román, 1994). La mayoría de los pacientes eran adultos jóvenes o relativamente jóvenes (edad media alrededor de los 45 años), masculinos, frecuentemente fumadores y tomadores de bebidas alcohólicas. Presentaban un síndrome polimorfo con sintomatología clínica diversa, donde predominaban las manifestaciones neuroópticas sobre las polineuropáticas: disminución de la agudeza visual de instalación progresiva, deterioro de la visión de colores, escotoma central o cecocentral, con alteraciones nulas o escasas de los reflejos pupilares y del fondo de ojo. En los pacientes con la forma mixta de la enfermedad se presentaron alteraciones neurológicas asociadas, caracterizadas básicamente por manifestaciones sensitivas simétricas en las extremidades (pinchazos o hincos, calambres, adormecimientos y quemazón), trastornos sensitivos como anestesia o hipoestesia en calcetín y/o guantes, principalmente para la sensibilidad vibratoria y el tacto fino, acompañadas en un pequeño porcentaje de pacientes de alteraciones mielopáticas.

Las investigaciones realizadas en los pacientes con NOE aportaron elementos que corroboraron hallazgos anteriores de disfunción de la BHE (González-Quevedo y col, 1993). La elevación de las PT, albúmina e IgG en el LCR fue fundamentalmente consecuencia de un incremento de la permeabilidad de la BHE, que se encontró en aproximadamente la cuarta parte de los pacientes, mientras que solo un 10% presentó bandas oligoclonales, indicativas de síntesis intratecal de inmunoglobulinas (Fishman, 1992).

El incremento de la permeabilidad de la BHE, determinado por la relación de las concentraciones de albúmina en suero y LCR, así como por el patrón electroforético del LCR, es un hallazgo relativamente frecuente en diferentes enfermedades neurológicas: síndrome de Guillain Barré, meningoencefalitis, enfermedad cerebrovascular, CIDP, EM en brote (Thompson, 1988; Fishman, 1992; Niebroj y col, 1992). El paso de proteínas a través de la BHE a nivel de los ganglios de las raíces dorsales y las raíces ventrales ocurre de una manera relativamente libre, pero en circunstancias patológicas, como es el caso del síndrome de Guillain Barré, esta barrera se hace más permeable, de manera que el nivel de proteínas totales en el LCR lumbar puede elevarse significativamente (Thompson, 1988; Fishman, 1992; Hartung, 1998). En el presente trabajo se encontró una asociación entre la frecuencia de aparición de daño de la BHE y la mayor severidad neurológica. Esto pudiera explicarse porque en los casos con una expresión neurológica más acentuada, la afectación de la BHE alcanza los raíces de la médula, con la consiguiente elevación de las PT en el LCR lumbar.

El mecanismo por el cual se produce el daño de la BHE en las polineuropatías de origen no inflamatorio no está claro, pero pudiera ser consecuencia de una lesión metabólica del endotelio vascular a nivel de la barrera sangre-LCR y sangre-tejido nervioso (Siegel y col, 1999). Dos ejemplos de alteraciones metabólicas relacionadas con un incremento de la permeabilidad de la BHE son la diabetes mellitus y la deficiencia de tiamina (Poduslo y col, 1988; Todd y Butterworth, 1999). La vulnerabilidad selectiva a nivel de las células endoteliales de los capilares cerebrales de regiones específicas en la deficiencia de tiamina, se ha asociada a un incremento en la producción de radicales libres, lo cual sugiere que los procesos de estrés oxidativo pueden tener una función importante (Calingasan y Gibson, 2000; Todd y Butterworth, 1999). Probablemente no sea este el único mecanismo que pueda contribuir a un daño de la BHE en la NOE, pero hay que tenerlo presente, ya que aunque no se encontró una mayor incidencia de deficiencia de tiamina en los pacientes que en los controles, sí fue más frecuente en poblaciones donde la incidencia de la

enfermedad era más elevada (Macías-Matos y col, 1996). No hemos encontrado reportes previos acerca del estado funcional de la BHE en las neuropatías de origen tóxico-nutricional. No obstante, no se puede descartar que las alteraciones metabólicas que se producen como consecuencia de un desbalance nutricional y/o las lesiones inducidas por un tóxico pudieran dañar la BHE a diferentes niveles del sistema nervioso. Un aspecto a tener presente en este contexto es la relación entre estrés mitocondrial, incremento de radicales libres y daño de la BHE (Noseworthy y Bray, 1998).

La presencia de un virus Coxackie en el LCR de pacientes con NE ha sido muy debatido y dio origen al desarrollo de una teoría nutro-viral de la enfermedad (Más Lago, 1998; Lago y col, 2001). La entrada al LCR de los virus que se encontraban circulando en la población (Más y col, 1995) pudo haber sido facilitada por el incremento de la permeabilidad de la BHE, demostrada en aproximadamente la cuarta parte de los pacientes. Dado que el daño de la BHE se determina por mediciones solamente a nivel del LCR lumbar, es posible que haya pacientes que tengan una permeabilidad alterada a nivel de los capilares cerebrales y que no se detecte por los métodos empleados. De ser esta suposición acertada, la cantidad de pacientes con daño de la BHE pudiera estar subestimada. Existen técnicas imagenológicas mucho más sensibles, como la resonancia magnética nuclear con gadolinium, que pueden detectar las alteraciones de la permeabilidad a nivel del tejido cerebral (Starr y col, 2003).

El análisis electroforético del LCR demostró la presencia de bandas oligoclonales en el 12% de los pacientes, aunque el índice IgG no mostró diferencias significativas con el control. La presencia de bandas oligoclonales es un hallazgo relativamente frecuente en enfermedades infecciosas e inflamatorias del sistema nervioso y hasta hace aproximadamente un año, constituyó uno de los criterios para el diagnóstico de la EM (Poser, 1998). El bajo porcentaje de aparición de bandas oligoclonales en los pacientes con NOE, no apoya la hipótesis de que en la enfermedad estén participando mecanismos inflamatorios o autoinmunes de una manera significativa.

La presencia de bandas oligoclonales de inmunoglobulinas en el LCR ha sido descrita en un 5 – 10% de los pacientes con otras patologías del SNC: infarto cerebral, demencia, tumores y lesiones estructurales (Link, 1976; Kostulas, 1985; Cohen y col, 2000). Es necesario destacar que Strony y col (1982) encontraron bandas oligoclonales en un 15% de pacientes con neuropatías periféricas. Los mecanismos subyacentes a la aparición de bandas oligoclonales en algunas enfermedades no infecciosas ni inflamatorias del sistema nervioso se desconocen, pero se piensa que pudiera estar relacionado con que la lesión del tejido nervioso da lugar a la presentación repetida de antígenos al sistema inmune, lo cual unido a alteraciones de la BHE, pudiera estimular la producción de anticuerpos específicos (Cohen y col, 2000). En el caso de la NOE pudiera hacerse una consideración similar. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que estos pacientes pudieran tener otra afección del sistema nervioso que no esté relacionada directamente con la epidemia y que clasificaron dentro del grupo por la similitud del cuadro clínico. Por ejemplo, la presencia de bandas oligoclonales en pacientes con neuritis óptica retrobulbar ha sido descrita, así como su posible relación con la aparición posterior de EM (Cole y col, 1998; Pokroy y col, 2001).

5.1.2 Patrón de aminoácidos en el suero de pacientes con NOE.

Existen escasas referencias acerca de la composición de aminoácidos en las ambliopías y mieloneuropatías de origen tóxico-nutricional, a pesar de que se sostiene que la carencia de aminoácidos azufrados tiene un papel importante en los mecanismos de detoxificación del cianuro, compuesto central en la fisiopatología de estas entidades (Román, 1994). Osuntokun y col (1968) reportaron una disminución del contenido sérico de aminoácidos azufrados en la neuropatía atáxica tropical en Nigeria, con ausencia o disminución de metionina y cisteína. En el presente trabajo no se encontró disminución de la metionina en los pacientes con NOE estudiados durante el período endémico, mientras que la cisteína no se pudo determinar con el sistema cromatográfico empleado.

Existen dos reportes relacionados con la composición de aminoácidos en la NE. Porrata y col (1995), después de una encuesta nutricional en la Isla de la Juventud, señalaron que una dieta deficiente en aminoácidos esenciales estaba fuertemente asociada con la enfermedad. Sin embargo, Pérez de Alejo y col (1994) no encontraron modificaciones en las concentraciones de los aminoácidos esenciales que determinaron en el plasma de 10 pacientes estudiados durante el período epidémico (Thr, Val, Met, Lys, y Phe). Nuestros resultados también indican que no existe una disminución de los siguientes aminoácidos esenciales en el suero de pacientes con NOE: Val, Met, Trip, Phe, Leu, Ileu y Lys. No obstante, se demostró disminución de Asp, Tau y Thr, de los cuales sólo el último puede ser considerado como aminoácido esencial en el hombre.

La comparación de las concentraciones de aminoácidos obtenidas en el grupo control, con las reportadas por otros autores (Qureshi y Baig, 1988; Orozco y col, 1989; Pérez de Alejo y col, 1994), no muestra variaciones importantes de ninguno de los aminoácidos esenciales, que hagan pensar en un déficit poblacional de base. Incluso, los niveles de Thr en controles y pacientes están por encima de lo que reportan estos autores. Por lo tanto, el estudio de los aminoácidos en el suero de los pacientes con NOE durante el período endémico, no mostró un patrón que indique una situación carencial importante en lo que se refiere a los aminoácidos esenciales. Además, la falta de variación de la Val, un aminoácido antropométrico, considerado como índice de malnutrición cuando está reducido (Young y col, 1982) indica una condición nutricional relativamente aceptable. Esta afirmación es apoyada por estudios evolutivos realizados después de la epidemia, los cuales indicaban que a pesar de que los pacientes habían tenido una mejoría clínica sustancial con el tratamiento vitamínico, la situación alimentaria no había mejorado (Rodríguez-Ojea y col, 2000; Arnaud, 2001b).

El cuadro clínico de los pacientes con NE no corresponde con el cuadro típico de una desnutrición proteico-calórica (Worthington y col, 1979) y los resultados del análisis de aminoácidos indican que el déficit de proteínas en la

dieta no llega a traducirse en una afectación de los niveles de aminoácidos esenciales ni de albúmina en el suero. Esto se podría explicar al menos por dos mecanismos: 1) que la ingestión de proteínas vegetales logre suplir las necesidades básicas de aminoácidos esenciales y 2) el aporte de aminoácidos por destrucción del tejido muscular. No obstante, es indudable que al momento del diagnóstico existía un estado de deficiencia energética aguda, caracterizado por una reserva corporal de energía deficiente y una insuficiente ingestión de energía, macronutrientes y micronutrientes (Rodríguez-Ojea y col, 2000).

La disminución de Tau en los pacientes con NOE pudiera revelar un déficit específico, ya que este aminoácido azufrado, que no forma parte de proteínas, es condicionalmente esencial en el hombre, necesita de piridoxina para su síntesis y está casi exclusivamente presente en productos de origen animal (Gauil, 1989; Lourenco y Camilo, 2002). La disminución de Tau sérica también podría responder a un incremento de su demanda por el organismo en las condiciones de estrés oxidativo, dada su función como agente antioxidante (Keys y Zimmerman, 1999; Guérin y col, 2001). Barnouin y col (2001) también reportaron niveles más bajos de Tau en conglomerados de suero de pacientes con la forma óptica de la NE. Sin embargo, en la muestra estudiada por Pérez de Alejo y col (1994) no encontraron variación de la concentración de Tau en el plasma de los pacientes con respecto a los controles, aunque estos autores no especifican qué forma clínica de la enfermedad estudiaron.

La Tau juega una importante función trófica en el sistema nervioso central y especialmente en la retina y el nervio óptico (Lake, 1988; Lima y col, 1999). En la retina es el aminoácido libre más abundante (Militante y Lombardini, 2002) y su deficiencia se ha demostrado que produce alteraciones retinianas y electrorretinográficas (ERG) en gatos, roedores y primates no humanos, y alteraciones ERG en niños con nutrición parenteral prolongada (Gauil, 1989; Huxtable, 1989).

Los hallazgos del presente trabajo: disminución de Tau sérica en los pacientes con NOE, correlación directa entre la concentración de Tau y la agudeza visual y la falta de correlación con la severidad de los síntomas

polineuropáticos, sugieren que este aminoácido podría estar desempeñando alguna función en los mecanismos fisiopatológicos de la forma óptica de la enfermedad. Así, un déficit de Tau en la dieta unido a un incremento de la demanda por el organismo y el sistema nervioso en particular, pudieran haber contribuido al desarrollo de la NOE. La importancia de la nutrición para el funcionamiento del sistema visual ha sido ampliamente revisado por Congdon y West (1999).

La disminución de Tau pudiera estar contribuyendo al incremento del estrés oxidativo reportado en la NE al menos por dos mecanismos: 1) por su contribución a la disminución de las defensas antioxidantes (Keys y Zimmerman, 1999; Militante y Lombardini, 2002), y 2) por una disminución de la incorporación de Tau a los tRNAs mitocondriales, que ha sido invocado por Suzuki y col (2002) como la causa de la miocardiopatía observada en gatos con bajos niveles de Tau, de una forma similar a lo que ocurre en las encefalomiopatías mitocondriales.

La Tau ha sido un suplemento utilizado como aminoácido protector en diferentes condiciones (Kendler, 1989; Birdsall, 1998) y para el tratamiento de algunas enfermedades del sistema nervioso en humanos: epilepsia, retinosis pigmentaria, migraña, enfermedad de Alzheimer (Fukuyama y Ochiai, 1982; McCarty, 1996; Birdsall, 1998; Head, 1999; Pasantés-Morales, 2002). Al analizar los neurotransmisores de la retina en la retinitis pigmentaria en ratas, se ha reportado que probablemente el primer signo de degeneración es la disminución del contenido de Tau (Okada y col, 2000). Por lo tanto, su uso como un agente terapéutico en la NOE, incluyendo pacientes con secuelas, podría ser de interés para mejorar la evolución de esta enfermedad.

A diferencia de lo que ocurre en la desnutrición proteico-calórica en que se presenta una elevación del Asp (Worthington y col, 1979; Jaffé y col, 1998), en nuestros pacientes detectamos una disminución de Asp en el suero. Esta disminución pudiera indicar un desbalance metabólico con un incremento de su consumo periférico y de su transaminación para la formación de oxaloacetato que se incorporaría al Ciclo de Krebs (Siegel y col, 1999).

Resulta interesante señalar que en el suero de los pacientes había un incremento significativo de la relación Glu/Tau, también elevada en la epilepsia y en enfermedades neurodegenerativas (Perry y col, 1977; Van Gelder, 1978). Es bien conocido que la Tau tiene una función significativa en la regulación de los eventos señalizadores inducidos por Glu y que previene la excitación por Glu a través de la regulación del Ca^{++} y del metabolismo energético (El Idrissi y col, 1998; Saransaari y Oja, 1999, 2000). La reducción de la relación Asp/Tau detectada en estos pacientes, estando ambos aminoácidos disminuidos en el suero, pudiera ser el resultado de una mayor reducción de Asp. La relación disminuida Tau/Val no va a favor de una deficiencia nutricional general y apoya la reducción selectiva de algunos aminoácidos en estos pacientes.

Los resultados de la cuantificación de aminoácidos en el suero de pacientes con NOE apoyan los resultados de otras investigaciones que sugerían la participación de factores no puramente nutricionales en la etiopatogenia de la enfermedad (Rodríguez-Ojea y col, 1998; Arnaud y col, 2001b), aunque no puede obviarse la reducción de ciertas moléculas o deficiencias selectivas que pudieran actuar como un gatillo en una población sometida a situaciones metabólicas y ambientales desfavorables.

5.1.3 Análisis de aminoácidos en el LCR de pacientes con NOE.

Uno de los resultados más novedosos y de impacto científico del estudio en humanos ha sido la elevación de los niveles de aminoácidos excitatorios (Glu y Asp) en el LCR en los pacientes con NOE. Se ha reportado que la excitotoxicidad producida por el incremento de Glu y/o Asp participa en los mecanismos responsables de la muerte neuronal en diversas enfermedades neurológicas (Jiménez-Jiménez y col, 1998; Barkhatova y col, 1998; Gucuyener y col, 1999; Skvortsova y col, 1999, Stover y Unterberg, 2000; Spreux-Varoquax y col, 2002). Kaakkola y col (1990) reportaron una deficiencia de glutámico deshidrogenasa (GDH), una enzima mitocondrial que participa en el catabolismo del Glu, en pacientes con ataxia olivopontocerebelosa (OPC), lo cual puede traer como consecuencia un incremento de Glu. Por este mecanismo, la deficiencia

mitocondrial que se plantea en la NE podría explicar el exceso de Glu encontrado en el LCR de estos pacientes. En el caso de las neuromielopatías tóxico-metabólicas no hemos encontrado antecedentes en la literatura revisada que aborde el perfil de aminoácidos en el LCR.

El Glu y Asp son los principales aminoácidos excitatorios en el SNC (Cotman y col, 2000) y su concentración en el LCR es un reflejo de los niveles extracelulares de los mismos (Spreux-Varoquax y col, 2002). La elevación observada en el LCR no parece ser consecuencia del daño de la BHE, por la ausencia de correlación encontrada entre los niveles en LCR y suero y los resultados de Stover y col (1997). El incremento de Glu en el LCR indica que puede haber afectación a nivel del SNC en la NOE y apoya los resultados de los estudios neurocognitivos realizados durante la epidemia que sugerían que además de las lesiones de las vías visuales y del sistema nervioso periférico, también estaba afectado el sistema nervioso central (Cubero y col, 1999). El aumento de Glu, sin una elevación compensatoria de la Tau (Stover y col, 1997), da lugar a una relación Glu/Tau incrementada en el LCR, lo cual empeoraría aun más las condiciones de excitotoxicidad, dada la función regulatoria de la Tau sobre la transmisión glutamatérgica mencionada con anterioridad.

Aunque clínicamente no se han establecido diferencias entre los pacientes del período epidémico y endémico (Santiesteban y col, 1997), sí se detectaron diferencias en cuanto a la composición aminoacídica del LCR: mayor contenido de Thr y Met en el período endémico y mayor de Gln en el período epidémico. Si comparamos con resultados de controles cubanos reportados en 1989 (Orozco y col, 1989) y con los valores reportados por Kaakkola y col (1990), podemos inferir que los niveles de Thr en el LCR de los pacientes en la endemia están dentro del rango normal, mientras que en controles y pacientes del período epidémico están bajos. Se ha reportado una marcada disminución de la Thr en el cerebro de animales con deficiencia de tiamina (Reynolds y Blass, 1975) y alteraciones severas del metabolismo de la Thr en la deficiencia de cobalamina (Ebara y col, 2001). El reporte de deficiencia de tiamina en la población y su posible asociación con la presencia de la enfermedad durante la epidemia

(Macías-Matos y col, 1996), podría explicar los niveles más bajos de Thr tanto en controles como en pacientes. La Thr y Met (ambos aminoácidos esenciales), a diferencia de otros aminoácidos neurotransmisores y neuromoduladores (Glu, Asp, Gly, GABA, Tau), no tienen funciones biológicas inherentes al tejido nervioso. La Thr atraviesa la BHE con relativa facilidad y puede ser convertida en Gly por la enzima serina-hidroximetiltransferasa o treonina aldolasa (Maes y col, 1998). Los niveles más altos de Thr en el LCR del período endémico, coinciden con mayores niveles de Gly en el LCR, aunque esta diferencia no resultó significativa para la Gly.

La Met es un donante clave de grupos metilo y está involucrada en la metilación de los neurotransmisores monoaminérgicos y fosfolípidos (Siegel y col, 1999). Además, el nivel de Met en el LCR podría ser expresión de su utilización para la formación de S-adenosilmetionina, la cual tiene un papel importante en el mantenimiento de los mecanismos antioxidantes del cerebro (Villalobos y col, 2000; De la Cruz y col, 2000; Patra y col, 2001).

Como en el cerebro el ciclo de la urea es poco efectivo, la remoción del amonio depende casi enteramente de la formación de Gln por vía de la Gln sintetasa, una enzima de localización predominantemente astrocítica (Dawson y col, 1995). La relación Glu/Gln se mantiene dentro de límites relativamente constantes en el sistema nervioso en condiciones normales (Perry, 1983) y en nuestra casuística, no se observó diferencia de esta relación con el control, ni entre ambos grupos de pacientes. Los niveles de Gln, aunque más bajos en la epidemia con respecto a la epidemia, estaban dentro del rango aceptado como normal en la literatura (Perry, 1983; Kaakkola y col, 1990), por lo que esta diferencia pudiera no ser relevante desde el punto de vista metabólico.

El incremento de las relaciones Glu/Tau, Glu/Gly y GABA/Gly en el LCR de los pacientes con neuropatía epidémica y endémica puede indicar la prevalencia de una condición excitatoria con una compensación a través del incremento de GABA con relación a Gly, un ligando de los receptores NMDA (Cotman y col, 2000). En el período endémico se detectaron otras relaciones de aminoácidos aumentadas con respecto al control, sin embargo, en la comparación entre el

período epidémico y endémico sólo alcanzaron incremento significativo las relaciones Thr/Val y Thr/Tau, probablemente relacionado con el mayor nivel de Thr observado en el LCR de estos pacientes.

Podemos concluir que el aminograma del LCR en los pacientes con NOE revela la existencia de un desbalance de aminoácidos que favorece la excitotoxicidad tanto en la epidemia como en la endemia, con algunas diferencias relativas al contenido de Met y Thr entre ambos períodos, cuyo significado en esta patología quedaría por esclarecer.

5.2 EXPERIMENTOS EN ANIMALES

5.2.1 Efectos de la administración crónica de metanol.

El origen multifactorial de la epidemia de neuropatía ha involucrado el déficit de micro y macronutrientes, sin que se haya podido establecer ninguno en particular como causante. Uno de los hallazgos reportados en pacientes con NOE fue un marcado déficit de folatos en más del 50% de los casos e hiperformatemia en el 25% (Eells y col, 2000b). Esto, conjuntamente con los resultados de Sadun y col (1994) que señalaban la presencia de aproximadamente un 1% de metanol en muestras de ron de destilación artesanal tomadas en la provincia de Pinar del Río, nos llevaron a plantear un diseño experimental para comprobar si la elevación ligera y prolongada de formato (sin llegar a los niveles observados en la intoxicación aguda) producía alteraciones en el contenido de aminoácidos en diferentes regiones del sistema nervioso. Sadun (1998) desarrolló un modelo de intoxicación crónica por metanol en ratas, que intentaba replicar las condiciones presentes en una parte de la población cubana durante el tiempo de la epidemia: ligera formatemia, con una deficiencia crónica de folatos, y alcanzaron concentraciones de formato sanguíneo en los animales que oscilaron entre 2 y 6 mM. En el presente trabajo se lograron obtener niveles incrementados de formato en las ratas tratadas con MTX-MeOH (aproximadamente 1.0 mM), pero por debajo de los valores anteriormente referidos. Estudios previos de intoxicaciones agudas tanto en

humanos como en modelos animales, han reportado concentraciones sanguíneas de formato que varían entre 6 y 18 mM (Lee y col, 1994; Eells y col, 1996). Por lo tanto, se logró el propósito de incrementar durante un tiempo prolongado los niveles de formato por debajo de las concentraciones que están descritas que producen efectos tóxicos agudos.

El menor aumento de peso en los animales deprivados de folatos por la administración de MTX, coincidió con los hallazgos de Sadun (1998) en animales sometidos a una deprivación alimentaria de folatos.

Como ya habíamos señalado anteriormente, los efectos de la exposición subcrónica o crónica a bajos niveles de metanol han sido poco estudiados, los diseños experimentales han sido muy variados y los resultados bastante controvertidos (Lee y col, 1991,1994; Poon y col, 1994; Sadun, 1998). Ingemansson (1983) describió cambios ERG en monos sometidos a la ingestión crónica de metanol. Algunos autores no han reportado alteraciones histológicas de retina y nervio óptico en animales expuestos crónicamente a la inhalación de metanol (Andrews y col, 1987; WHO, 1997). Sin embargo, en los estudios conducidos por Sadun (1998) se observó degeneración axonal, vacuolización y zonas de edema, así como alteraciones a nivel de las mitocondrias en el nervio óptico de los animales con deficiencia de folatos y tratados con metanol.

A pesar de que los sistemas neurotransmisores de la retina están muy bien definidos (Kalloniatis y Tomisich, 1999; Pow, 2001), no tenemos conocimiento de que se hayan conducido estudios para aclarar el papel que desempeñan los sistemas aminoacídrgicos en la fisiopatología de la toxicidad por metanol. Los resultados del presente trabajo indican que no hubo alteraciones de las concentraciones de aminoácidos en la retina, hipocampo y corteza posterior en ninguno de los grupos de tratamiento.

El efecto principal de la administración de MTX-metanol fue un incremento en los niveles de aspartato en el nervio óptico, lo cual coincide con una elevación de formato en la sangre en estos grupos de tratamiento. Estos resultados sugieren que la elevación de los niveles de aspartato pudiera estar relacionada con la acumulación de formato.

¿Cómo se pudiera explicar el aumento de aspartato en el nervio óptico y no en la retina? Iuvone (1986) encontró que los niveles de aspartato y glutamato eran más elevados en la capa de células ganglionares que en las demás capas de la retina; sin embargo reportaron que las concentraciones en nervio óptico eran bajas y concluyeron que posiblemente estos aminoácidos o sus enzimas sintéticas eran transportados rápidamente desde los cuerpos neuronales a las terminaciones sinápticas. Teniendo en cuenta lo anteriormente referido y la hipótesis desarrollada por Sadun (1998), el incremento de aspartato en el nervio óptico y no en la retina, podría explicarse por el retardo del transporte axoplásmico, como consecuencia de la depleción energética provocada por el efecto neurotóxico del formato, que pudiera dar lugar a su acumulación a nivel axonal (nervio óptico). No obstante, también hay que tener presente que la retina es una estructura mucho más heterogénea que el nervio óptico, con una gran diversidad neuronal (Masland, 2001), mientras que el nervio óptico está formado mayoritariamente por los axones de las células ganglionares (Zigmond y col, 1998). De esta manera, los cambios en la retina, si dependen de un grupo celular específico, podrían verse enmascarados.

El aspartato tiene dos funciones fundamentales en el sistema nervioso: en el metabolismo energético intermediario y como neurotransmisor y precursor de glutamato (Siegel y col, 1999). Aunque el Glu es considerado el principal neurotransmisor que media la función excitatoria en el SNC, otros compuestos activos naturales también pueden dar lugar a la activación de los receptores de aminoácidos excitatorios y el l-aspartato es el neurotransmisor que con más efectividad mimetiza las acciones del Glu (Cotman y col, 2000). Hay evidencias de la presencia de compartimientos significativos de aspartato en la retina de muchas especies, pero su patrón de distribución no apoya totalmente una función como neurotransmisor (Pow, 2001). Sin embargo, los resultados de Kubrusky y col (1998) indican que en la retina el aspartato modula la función excitatoria sobre una serie de células GABAérgicas a través de la activación selectiva de receptores NMDA.

Endo y col (1999) encontraron disminución de aspartato aminotransferasa (AAT) mitocondrial en retinas isquémicas e hipóxicas en la rata, siendo ésta la que tiene una actividad más elevada entre las enzimas involucradas en el metabolismo del Glu. Sería posible que en las condiciones de deficiencia mitocondrial provocada por la administración de metanol, la entrada de Ca^{++} a las células de la retina esté incrementada, con la consiguiente afectación de la actividad de varias enzimas, entre ellas la AAT, desplazando la reacción de transaminación hacia la formación de Asp, con la consiguiente elevación de los niveles del mismo.

Aunque los mecanismos excitotóxicos del Asp no se conocen totalmente, se sospecha que actúa a través de la activación de los receptores NMDA, dando lugar a la entrada de Ca^{++} a las células (Cotman y col, 2000). Se ha observado que las concentraciones elevadas de metanol, incrementan el Ca^{++} intracelular, y se ha propuesto este mecanismo para explicar el edema y la hemorragia cerebral, así como los infartos cerebrales y retinianos inducidos por metanol (Li y col, 1999). Otro mecanismo de elevación del Ca^{++} intracelular pudiera ser el fallo energético mitocondrial secundario a la inhibición de la citocromo oxidasa por el formato (Nicholls y col, 2001). La posibilidad de que una alteración de la homeostasis del Ca^{++} esté involucrada en la lesión del nervio óptico inducida por isquemia cerebral fue señalada por Levin y Gordon (2002). Kalloniatis y Tomisich (1999) interpretaron los cambios en la localización del Asp en la retina del pollo y la inducción de una intensa inmunorreactividad al Asp bajo condiciones anóxicas en la retina como una expresión de los cambios inducidos por el metabolismo en la composición de aminoácidos, probablemente debido a una alteración en el equilibrio de las reacciones catalizadas por aminotransferasas.

El incremento del contenido de Glu, Asp, Gln y Tau en el hipocampo de todos los grupos de animales donde se administró metanol, independientemente de que se adicionara MTX, sugiere que estas alteraciones son debidas a la acción directa del metanol e independientes de la acumulación de formato. Se han descrito efectos directos de la administración de metanol sobre las respuestas contráctiles de las arterias cerebrales en caninos, atribuidos a una disminución crítica de

[Mg²⁺] intracelular, que a su vez da lugar a un incremento de [Ca²⁺] intracelular (Li et al, 1999). Ambos iones divalentes desempeñan un papel crucial en la regulación de la acción de los neurotransmisores (Siegel y col, 1999). Así, el incremento de Asp y Glu en el hipocampo inducido por metanol pudiera proveer una explicación para algunos síntomas del SNC observados en la intoxicación por metanol, sobre la base de su acción directa sobre las arterias cerebrales.

5.2.2 Efecto de las variaciones en el contenido de taurina sobre los cambios producidos por la administración crónica de metanol.

Los resultados anteriormente señalados en los pacientes con NOE: detección de niveles bajos de Tau plasmática y la disminución de la relación Glu/Tau en el LCR, que habla a favor de una falta de compensación del incremento de Glu en el LCR con un incremento de Tau, así como los antecedentes del efecto protector de la Tau sobre el SNC y especialmente a nivel del sistema visual, nos indujeron a investigar los efectos de modificar las concentraciones de Tau en el diseño experimental en ratas. Este β-aminoácido desempeña un papel significativo en la modulación de la excitotoxicidad por glutamato a través de la regulación de la homeostasis del calcio y el metabolismo energético mitocondrial (El Idrissi, 1999; Militante y Lombardini, 1999). Como entre los mecanismos de acción del metanol están la afectación de la función mitocondrial (Eells y col, 1996; Wallace y col, 1997) y la elevación del Ca⁺⁺ intracelular (Li y col, 1999), sería posible esperar que la administración de Tau tuviera un efecto protector, o que su disminución agravara o produjera otras alteraciones de los sistemas aminoacídicos.

En el presente trabajo la suplementación de Tau no previno el incremento de formato sanguíneo ni de Asp en el nervio óptico de los animales tratados con MTX-MeOH. Solamente se observó un discreto efecto protector de la Tau sobre la elevación de Asp en el hipocampo de los animales tratados con MeOH y MTX-MeOH (no dependiente de la acumulación de formato). Como hubo incremento de Tau en todos los grupos de animales tratados con MeOH, este efecto pudiera estar relacionado con las propiedades neuroprotectoras de la Tau en el hipocampo desencadenadas por la estimulación de los receptores NMDA

en condiciones de daño celular (Saransaari y Oja, 2003) y/o por su acción como agonista de los receptores de Gly en el hipocampo, donde posiblemente tiene una función importante en la regulación del procesamiento de la información (Mori y col, 2002). Es necesario relacionar los resultados anteriormente mencionados con la función crucial del hipocampo en los procesos de formación de la memoria (Zigmond y col, 1999) y las alteraciones de la memoria reportadas por Cubero y col (1999) en pacientes con NE. En este contexto sería interesante investigar la efectividad de la Tau sobre los procesos de memoria. A pesar de que hubo incremento de la concentración plasmática de Tau después de la administración de Tau al 2%, el contenido de este aminoácido no aumentó en los tejidos estudiados (retina, nervio óptico, hipocampo y corteza posterior), lo cual pudiera explicar el pobre efecto protector observado.

Existen resultados controvertidos acerca del incremento de Tau en tejido nervioso después de su administración en animales de experimentación. Sturman y Messing (1996) reportaron aumento de Tau en distintas regiones cerebrales en gatos con deficiencia de este aminoácido a los cuales se les suministró un suplemento de Tau al 0.01%. Sin embargo, Mijanovic y col (1996) no encontraron aumento de Tau en el cerebro del ratón después de su inyección i.v., mientras que Eppler y col (1999) observaron incremento de Tau en el hipocampo de ratas, pero no en otras áreas cerebrales, después de la administración de un suplemento de Tau al 1.5%. En ratas envejecidas se detectó una corrección del déficit de Tau con la edad al administrar Tau al 1.5% (Dawson y col, 1999). Aunque Di Leo y col (2002) no midieron las concentraciones tisulares de Tau, reportaron que la administración de Tau al 2 y 5% aminora las alteraciones retinianas en ratas diabéticas. El paso de la Tau de la periferia al tejido nervioso está muy regulado a nivel de la BHE y se realiza a través de un transportador dependiente de Na⁺, específico para β-aminoácidos (Milatante y Lombardini, 2002). Así, no es de extrañar que en situaciones normales no se logre un efecto directo sobre las concentraciones en el sistema nervioso (Satsu y col, 2002), lo cual no descarta que en condiciones patológicas (por ejemplo, cuando la BHE esté dañada o que exista un déficit del aminoácido

azufrado), la administración de Tau pudiera repercutir sobre los niveles tisulares centrales.

La administración de β -Ala al 5% para provocar una disminución de los niveles tisulares de Tau en los animales, produjo disminución de las concentraciones de Tau en plasma, hipocampo y corteza posterior, pero no en retina y nervio óptico. Por lo tanto, el incremento de Thr en la retina al asociar β -Ala al 5% con MTX-MeOH no está relacionado con un déficit de Tau y pudieran estar asociado a la entrada de β -Ala a las células y la producción de modificaciones bioquímicas al asociarse con el MTX-MeOH. En el hipocampo la asociación de β -Ala al 5% con MTX-MeOH produjo una elevación de Asn, la amida del Asp, sin variaciones en los niveles de Asp. Este efecto pudiera estar en relación con la disminución de Tau en este tejido, pero no se puede descartar que esté asociado con la acción directa de la β -Ala en presencia de MTX-MeOH. Por el momento no tenemos una explicación para estos hallazgos.

5.2.3 Integración de los resultados de los estudios en humanos y en animales de experimentación.

Como habíamos expresado con anterioridad, hasta el momento no se ha podido implicar a la deficiencia nutricional como factor causal único en la etiología de la NE, a pesar de los cuantiosos elementos que apoyan una contribución importante del estado nutricional de la población en la aparición de la enfermedad. Situaciones similares han ocurrido con otras epidemias de mieloneuropatías ópticas en el mundo, donde la multifactorialidad de causas parece ser la realidad (Román, 1998). Los resultados del presente trabajo no rechazan la hipótesis nutricional de la NOE, pero sí aportan elementos que indican que el factor nutricional no llega a provocar las alteraciones bioquímicas esperadas de acuerdo a los estudios epidemiológicos que se han llevado a cabo. A pesar de que las evidenciadas limitaciones en el aporte de nutrientes hacían pensar en la presencia de un déficit importante de aminoácidos esenciales, esto no se comprobó.

Otros autores (Bonet y col, 2000; Rodríguez-Ojea y col, 2000; Arnaud, 2001b) han señalado que deben existir otros factores, unidos al déficit selectivo de determinadas moléculas, algunas de las cuales se sabe que participan en la protección antioxidante del organismo, que hayan contribuido al desencadenamiento de la enfermedad. En este aspecto, la disminución de Tau detectada en los pacientes con NOE debe ser tomada en cuenta, dada su conocida participación en el funcionamiento del sistema nervioso y especialmente de la retina. No obstante, en los experimentos en animales, la suplementación o la disminución de Tau no provocaron acciones protectoras o adversas evidentes sobre los parámetros estudiados, excepto un ligero efecto protector de la suplementación de Tau sobre la elevación de Asp en el hipocampo de animales tratados con MeOH.

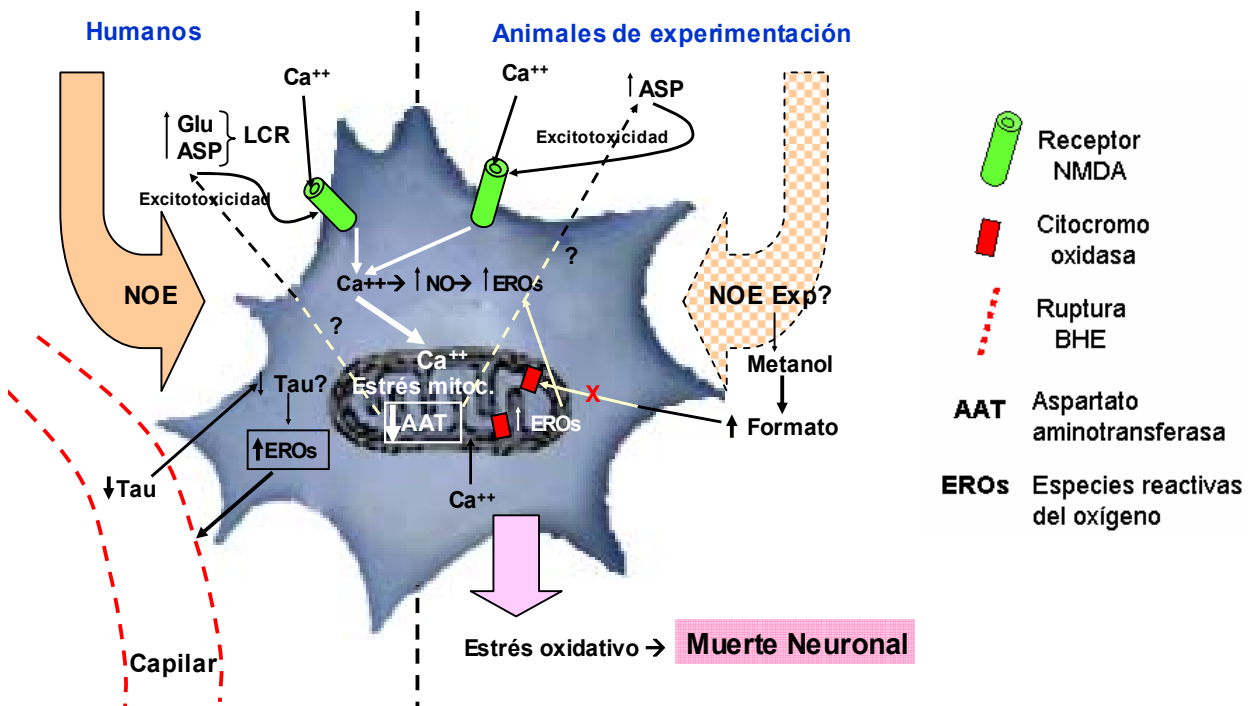
Se ha colocado al estrés oxidativo como el centro hacia donde confluyen diferentes mecanismos conducentes al desarrollo de la NE (fallo mitocondrial, déficit de antioxidantes y exceso de radicales libres, entre otros). Sin embargo, existen otros procesos que también se pueden asociar con un incremento del estrés oxidativo, como son la permeabilidad de la BHE y la excitotoxicidad. Existen evidencias de que el estrés oxidativo y la excitotoxicidad provocan ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) (Noseworthy y Bray, 1998; Cardelli y col, 2002) y por esa vía también afectan la homeostasis del tejido nervioso.

La demostración de una permeabilidad incrementada de la BHE en un grupo de pacientes con NOE puede ser consecuencia de varios procesos que inciden a nivel del endotelio de los capilares del SNC y periférico y que pudieran estar actuando en paralelo: deficiencia de tiamina, exceso de radicales libres por fallo mitocondrial, neurotoxinas exógenas y excitotoxicidad. Esto a su vez produce daño perivascular por la salida de albúmina, proteasas, toxinas ambientales presentes en la sangre, agentes infecciosos o simplemente por la exposición de las neuronas a niveles alterados de electrolitos en el espacio intersticial (Zheng, 2001; Wardlaw y col, 2003).

La presencia de excitotoxicidad se infiere por los resultados de los estudios en humanos (incremento de aminoácidos excitatorios en el LCR de pacientes con

NOE) y en animales de experimentación (incremento de aspartato en el nervio óptico de ratas con hiperformatemia por administración crónica de metanol). Durante los últimos años se ha hecho énfasis en las relaciones entre excitotoxicidad y la inducción de estrés oxidativo y se ha reportado que la toxicidad por estimulación de los receptores NMDA produce iones superóxido y radicales libres (Lafon-Cazal y col, 1993). Hay que tener presente también, que fueron detectadas concentraciones elevadas de formato en un grupo de pacientes con NOE (Eells y col, 2000b), coincidiendo con un reporte de niveles altos de MeOH en bebidas de destilación artesanal en la provincia de Pinar del Río (Sadun, 1994). Los resultados experimentales del presente trabajo indican que el metanol, como tóxico exógeno pudiera haber estado entre los factores que incidieron en el desencadenamiento de la NOE en algunos pacientes, no solamente por el fallo mitocondrial selectivo producido por la acción neurotóxica del formato, sino también a través de un mecanismo de excitotoxicidad, expresado por un aumento de Asp en el nervio óptico.

Una visión integradora de nuestros resultados con los conocimientos aportados por la literatura científica para explicar la fisiopatología de la NOE se muestra en el siguiente esquema simplificado:



En la NE se ha establecido claramente la existencia de un fallo mitocondrial, con un déficit en la generación de energía, un incremento de la producción de EROs y un déficit de sustancias antioxidantes (Pérez Cristiá, 1998; Sadun, 1998). En los animales de experimentación, la inhibición de la citocromo oxidasa por el formato también puede llevar a un fallo mitocondrial. En ambos casos aumenta la producción de EROS y la entrada de Ca^{++} a la mitocondria como consecuencia del estrés mitocondrial. El incremento de Ca^{++} puede inhibir la actividad de varias enzimas mitocondriales, entre ellas la AAT, con la consiguiente elevación de los niveles de Asp (Endo y col, 1999). El incremento de aminoácidos excitatorios (Asp y Glu) en el LCR de los pacientes con NOE y de Asp en el nervio óptico de los animales, estimula de un manera excesiva los receptores NMDA (excitotoxicidad) y como consecuencia se produce una mayor entrada de Ca^{++} a la célula. La elevación del Ca^{++} intracelular tiene múltiples efectos, entre ellos la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), con el consiguiente aumento de la producción de óxido nítrico (NO), que al unirse con las EROs forma los peroxinitritos, radicales libres con un alto nivel de toxicidad (Siegel y col, 1999). El aumento de las EROs puede dañar a su vez la BHE (Noseworthy y Bray 1998), contribuyendo así a la desestabilización del ambiente extracelular que rodea las neuronas y a la pérdida de la homeostasis del tejido nervioso. La disminución de Tau en los pacientes con NE pudiera estar asociada con una disminución tisular de la misma, lo cual agravaría el déficit de sustancias antioxidantes, dado el conocido efecto protector de este β -aminoácido sobre el daño producido por las EROs (Koyama y col, 1992).

En la fisiopatología de la NE se ha colocado al estrés mitocondrial y por consiguiente al estrés oxidativo como la piedra pivotal que desencadena finalmente la enfermedad en sus diferentes variantes. Con el presente trabajo de tesis hemos aportado evidencias de la participación de otros procesos, (disminución de Tau, daño de la BHE, excitotoxicidad y neurotoxicidad del metanol), que están estrechamente relacionados con la producción de estrés

oxidativo, que en un momento determinado traspasa el umbral de funcionamiento de las células nerviosas y específicamente de las células ganglionares de la retina (Sadun, 1998; 2002). Esta alteración severa de la homeostasis del sistema nervioso conduce finalmente a un daño celular irreversible y por consiguiente a la manifestación clínica de la NE. La dilucidación de los mecanismos moleculares que intervienen en la NE mejorarán la comprensión de otros insultos neurotóxicos y enfermedades neurodegenerativas que involucran una disfunción mitocondrial.

Como resultado de los estudios realizados en pacientes con NOE y en animales de experimentación sometidos a la administración crónica de metanol, se demostró que existe un desbalance de aminoácidos que favorece la excitotoxicidad, un incremento de la permeabilidad de la BHE y una asociación del tóxico mitocondrial, formato, con la presencia de excitotoxicidad. Estos procesos pueden favorecer el estado de estrés oxidativo y alterar la homeostasis del sistema nervioso, pudiendo haber contribuido al desarrollo de la enfermedad. Lo anteriormente expuesto concuerda con nuestra hipótesis de que *“El desbalance aminoacídico facilita la pérdida de la homeostasis en el sistema nervioso, desencadenando procesos de estrés oxidativo, toxicidad, excitotoxicidad y el concomitante daño de la barrera hematoencefálica, todo lo cual contribuye a la fisiopatología de la neuropatía óptica epidémica”*.

Los resultados de este trabajo de tesis tienen los siguientes elementos novedosos:

1. Nuevo conocimiento sobre la composición de aminoácidos en el LCR de pacientes con NOE, que demuestra la participación de mecanismos de excitotoxicidad en la fisiopatología de esta enfermedad.
2. Nuevo conocimiento acerca de la presencia de una disfunción de la BHE en una epidemia de mieloneuropatía óptica.

3. Resultados originales sobre el estado de compuestos neurotransmisores aminoacidérgicos en experimentos de intoxicación crónica por metanol, que demuestran la participación de mecanismos fisiopatológicos de excitotoxicidad a nivel del nervio óptico.
4. Resultados de mediciones bioquímicas en el suero de pacientes con NOE (albúmina y aminoácidos esenciales) que apoyan evidencias anteriores acerca de la participación de factores no nutricionales en el desarrollo de la epidemia.

VI. CONCLUSIONES

1. El incremento de la permeabilidad de la BHE en los pacientes con NOE expone las células nerviosas a un ambiente adverso para su normal funcionamiento, contribuyendo a empeorar la situación de estrés oxidativo y a alterar la homeostasis del tejido nervioso en esta enfermedad.
2. El contenido de albúmina y aminoácidos esenciales en el suero de los pacientes con NOE no indican la presencia de una carencia proteica, aunque la disminución selectiva de taurina pudiera estar desempeñando alguna función en los mecanismos fisiopatológicos de la forma óptica de la enfermedad.
3. El desbalance de aminoácidos excitatorios, conducente a la excitotoxicidad interviene en los mecanismos fisiopatológicos de la NOE y de la exposición crónica al metanol.
4. La administración de taurina contrarresta la excitotoxicidad inducida directamente por el metanol en el hipocampo, pero no la inducida por la acumulación de formato en el nervio óptico.
5. La asociación de la β -alanina con el MTX-MeOH produjo algunas alteraciones en el balance de aminoácidos en la retina y el hipocampo de animales tratados crónicamente con metanol, cuya asociación con el déficit de Tau queda por esclarecer.

VII. RECOMENDACIONES:

1. En caso de aparición de algún brote nuevo de NE realizar algunos estudios para completar el conocimiento acerca de la fisiopatología de la enfermedad:
 - a) Evaluación del estado de la BHE utilizando la resonancia magnética nuclear (RMN) con gadolinium, que permite detectar una disfunción de la misma a nivel del tejido cerebral.
 - b) Evaluación del estado funcional de la BHE, del patrón de aminoácidos séricos y en LCR y de los niveles de formato en sangre de pacientes en la forma periférica pura de la enfermedad.
2. Hacer una valoración clínica actual de los pacientes que presentaron bandas oligoclonales en el LCR para corroborar el diagnóstico definitivo de los mismos.
3. Determinar la distribución del aspartato en la retina de las ratas tratadas crónicamente con metanol, para precisar si la elevación del mismo en el nervio óptico se corresponde con un incremento de este aminoácido en algún tipo celular específico.
4. Determinar la actividad de aspartato aminotransferasa mitocondrial en el modelo experimental de administración crónica de metanol para precisar si el incremento de aspartato está relacionado con una inhibición de la misma.
5. Evaluar el efecto de la administración de taurina sobre la memoria en animales de experimentación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albin R L (2000). Basal ganglia neurotoxins. *Neurol Clin*, 18: 665 - 80.
2. Andrews LS, Clary JJ, Terrill JB, Boilte HF (1987). Subchronic inhalation toxicity of methanol. *J Toxicol Environ Health*, 20: 117 – 120.
3. Arnaud J, Fleites-Mestre P, Chassagne M, Verdura T, Barnouin J, Richard M-J, Chacornac J-P, García I, Pérez-Cristia R, Favier AE and the SECUBA group (2001a). Seasonal variations of antioxidant imbalance in Cuban healthy men. *Eur J Clin Nutr* 55: 29 – 38.
4. Arnaud J, Fleites-Mestre P, Chassagne M, Verdura T, García I, Hernández T, Gautier H, Favier A, Pérez-Cristia R, Barnouin J, and Neuropathy epidemic group (2001b). Vitamin B intake and status in healthy Havanan men, 2 years after the Cuban neuropathy epidemic. *Br J Nutr*, 85: 741 – 48.
5. Aziz MH, Agrawal AK, Adhami VM, Ali MM, Baig MA, Seth PK (2002). Methanol-induced neurotoxicity in pups exposed during lactation through mother: role of folic acid. *Neurotoxicol Teratol*, 24: 519 - 27.
6. Barceloux DG, Bond GR, Krenzelok EP, Cooper H, Vale JA (2002). American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol*, 40: 415 - 46.
7. Barford PA, Blair JA and Malghani MA (1980). The effect of methotrexate on folate metabolism in the rat. *Br. J. Cancer*, 41: 816 – 820.
8. Barkhatova VP, Zavalishin IA, Askarova LSh, Shavratskii VKh, Demina EG (1998). Changes in neurotransmitters in multiple sclerosis. *Neurosci Behav Physiol*, 28: 341 - 44.
9. Barnouin J, Cristia RP, Chassagne M, Barrios TV, Arnaud J, Mestre PF, Favier, A (2000). Vitamin and nutritional status in Cuban smokers and nonsmokers in the context of an emerging epidemic neuropathy. *Int J Vitam Nutr Res* 70: 126 – 138.

10. Barnouin J, Barrios TV, Chassagne M, Cristia RP, Arnaud J, Fleites Mestre PF, Montoya ME, Favier, A (2001). Nutritional and food protection against epidemic emerging neuropathy. Epidemiological findings in the unique disease-free urban area of Cuba. *Int J Nutr Res*, 71: 274 – 285.
11. Batista Moliner R y Serrano Verdura C (1997). Neuropatía epidémica. Descripción clinicopatológica y epidemiológica. *Rev Cubana Med Gen Integr* ; 13(3): http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol13_3_97/mgi06397.htm.
12. Beck MA (2000). Nutritionally induced oxidative stress: effect on viral disease. *Am J Clin Nutr*, 71: 1676S - 1679S.
13. Birdsall, TC (1998) Therapeutic applications of taurine. *Altern. Med. Rev.* 3, 128-136.
14. Black KA, Tephly TR (1983). Effects of nitrous oxide and methotrexate administration on hepatic methionine synthetase and dihydrofolate reductase activities, hepatic folates, and formate oxidation in rats. *Mol Pharmacol*, 23: 724 – 30.
15. Bonet M, Varona P, Diez P, Chang M, García R, y Cañizares M (2000). Neuropatía epidémica cubana: Algunos factores de riesgo en la población. *Rev Cubana Med Trop* 52: 126 – 132.
16. Borrajero I, Pérez JL, Domínguez C, Chong A, Coro RM, Rodríguez H, Gómez N, Román GC, Navarro L (1994). Epidemic neuropathy in Cuba: morphological characterization of peripheral nerve lesions in sural nerve biopsies. *J. Neurol. Sci*, 127: 68 - 76.
17. Burcet J, Zabay J.M, Usón M., Mulet J., Figuerola A., Viander C (2000). Síntesis Intratecal de IgG valorada mediante diferentes fórmulas: Interés del análisis multivariante para el diagnóstico de esclerosis múltiple. *Rev. Neurol*, 31: 812 - 816.

18. Calingasan NY, Gibson GE (2000). Dietary restriction attenuates the neuronal loss, induction of heme-oxygenase-1 and blood-brain barrier breakdown induced by impaired oxidative metabolism. *Brain Res*, 885: 62 – 69.
19. Cardelli P, Scarpa S, Ceci F, Lucarelli M, Tabacco F, Ferraguti G, Brisdelli F, Strom R, Bozzi A (2002). Effects of different oxidizing agents on neutral amino acid transport systems in isolated bovine brain microvessels. *Neurochemistry International* 41: 29 – 36.
20. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA (2002). Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction: genetic and acquired optic neuropathies. *Neurochem Int*, 40: 573 – 84.
21. Cassarino DS y Bennett JP Jr (1999). An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev*, 29: 1 – 26.
22. CDC. Centers for Disease Control and Prevention (1994). Epidemic neuropathy – Cuba, 1991-1994. *JAMA*, 271: 1154 - 56.
23. Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Boddeker I, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B (2001). Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain*, 124: 2169 – 76.
24. CNFIT. The Cuban Neuropathy Field Investigation Team (1995). Epidemic optic neuropathy in Cuba – Clinical characterization and risk factors. *N Eng J Med*, 333: 1176-82.
25. Cohen O, Biran I, Steiner I (2000). Cerebrospinal Fluid Oligoclonal IgG Bands in Patients With Spinal Arteriovenous Malformation and Structural Central Nervous System Lesions. *Arch Neurol.*; 57: 553 - 557.

26. Cole SR, Beck RW, Moke PS, Kaufman DI, Tourtellotte WW (1998). The predictive value of CSF oligoclonal banding for MS 5 years after optic neuritis. Optic Neuritis Study Group. *Neurology*, 51: 885 - 887.
27. Congdon NG, West KP (1999). Nutrition and the eye. *Curr Opin Ophthalmol*, 10: 464 - 73.
28. Cook RJ, Champion KM, Giometti CS (2001). Methanol toxicity and formate oxidation in NEUT2 mice. *Arch Biochem Biophys*, 15: 192 - 98.
29. Cotman C.W, Kahle J.S., Miller S.E., Ulas J, y Bridges R.J. (2000) Excitatory Amino Acid Neurotransmission. In: *Psychopharmacology, The Fourth Generation of Progress On Line Edition* (<http://www.acnp.org>)
30. Cubero L, Mayor J, Almirall P, Valdés M (1999). Memory disorders in the epidemic neuropathy. *Rev Neurol*, 28: 343 – 348.
31. Dang CV (1981). Tobacco-alcohol amblyopia: a proposed biochemical basis for pathogenesis.. *Med. Hypotheses*, 7: 1317 – 28.
32. Dawson R, Flint Beal M, Bondy SL, Di Monte DA, Isom GE (1995). Excitotoxins, aging and neurotoxins: implications for understanding human neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol*, 134: 1 – 17.
33. Dawson R, Liu S, Eppler B, Patterson T (1999). Effects of dietary taurine supplementation or deprivation in aged male Fischer 344 rats. *Mech Ageing Dev*; 107: 73 – 91.
34. De la Cruz JP, Pavia J, González-Correa TA, Ortiz P, Sánchez de la Cuesta F (2000). Effects of chronic administration of S-adenosyl-methionine on brain oxidative stress in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 361: 47-52.

35. De la Fuente J, Rodríguez MP, Berlanga J, Hayes O (1998). Etiología nutro-viral de la neuropatía epidémica. *Rev Cubana Med Trop*; 50 (Supl): 235 - 40.
36. De la Fuente J, Hidalgo Y, Ochagavia ME, Muzio V, Rodríguez MP (1999). Analysis of enterovirus sequences recovered from the cerebrospinal fluid of patients with epidemic neuropathy. *Ann Trop Med Parasitol*, 93: 153 - 61.
37. Di Leo MAS, Santini SA, Cerccone S, Lepore D, Gentiloni Silveri N, Caputo S, Greco AV, Giardina B, Franconi F, Ghirlanda G (2002). Chronic taurine supplementation ameliorates oxidative stress and Na-K-ATPase impairment in the retina of diabetic rats. *Amino Acids*, 23: 401– 06.
38. Dorman DC, Moss OR, Farris GM, Janszen D, Bond JA and Medinsky MA (1994). Pharmacokinetics of inhaled (¹⁴C)Methanol and methanol-derived (¹⁴C)Formate in normal and folate-deficient Cynomolgus Monkeys. *Toxicol & Appl Pharmacol*. 128, 229 - 38.
39. Eaton L (2003). Human genome project completed. *BMJ*. 326 (7394): 838.
40. Ebara S, Toyoshima S, Matsumura T, Adachi S, Takenaka S, Yamaji R, Watanabe F, Miyatake K, Inui H, Nakano Y (2001). Cobalamin deficiency results in severe metabolic disorder of serine and threonine in rats. *Biochim Biophys Acta*, 1568: 111 – 17.
41. Ebers GC, Paty DW. (1980). CSF electrophoresis in one thousand patients. *Can J Neurol Sci* , 7: 275 – 80.
42. Eells JT, Black KA, Makar AB, Tedford CE, Tephly TR (1983). Methanol toxicity in the monkey: effects of nitrous oxide and methionine. *J Pharmacol Exp Therap*. 227: 349 – 353.

43. Eells JT (1991). Methanol-induced visual toxicity in the rat. *J Pharmacol Experim Therap*, 257: 56 - 63.
44. Eells JT, Salzman MM, Trusk TC (1995). Inhibition of retinal mitochondrial function in methanol intoxication. *Toxicologist*, 15: 21.
45. Eells JT, Salzman MM, Lewandowski MF y Murray TG (1996). Formate-induced alterations in retinal function in methanol-intoxicated rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 140: 58 - 69.
46. Eells JT, Henry MM, Lewandowski MF, Seme MT, y Murray TG (2000a). Development and characterization of a rodent model of methanol-induced retinal and optic nerve toxicity. *Neurotoxicology*, 21: 321 – 30.
47. Eells JT, González-Quevedo A, Santiesteban R, McMartin KE, Sadun AA (2000b). Deficiencia de folato y concentraciones elevadas de formato en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con neuropatía óptica epidémica. *Rev Cubana Med Trop*, 52: 21 – 23.
48. Eells JT, Henry MM, Summerfelt P, Wong-Riley MTT, Buchmann EV, Kane M, WhelanNT, Whelan HT (2003). Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc Natl Acad Sc USA*, 100: 3439 – 44.
49. Egashira Y y Matsuyama H (1982). Subacute myelo-optico-neuropathy (SMON) in Japan. With special reference to the autopsy cases. *Acta Pathol Jpn*, 32 Suppl 1: 101 – 16.
50. El Idrissi A, Harris C, Trenkner E. Taurine modulates glutamate- and growth factors-mediated signaling mechanisms. En: *Taurine 3*. Eds. Schaffer et al, Plenum Press, New York, 385 - 96, 1998.

51. El Idrissi A, Trenkner E. (1999) Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J. Neurosc*, 19: 9459 – 68.
52. Endo S, Ishiguro S, Tamai M (1999). Possible mechanism for the decrease of mitochondrial aspartate aminotransferase activity in ischemic and hypoxic rat retinas. *Biochim Biophys Acta*, 1450: 385 – 96.
53. Endresen GK, Husby G (2001). Folate supplementation during methotrexate treatment of patients with rheumatoid arthritis. An update and proposals for guidelines. *Scand J Rheumatol*, 30: 129 - 34.
54. Eppler B, Patterson TA, Zhou W, Millard WJ, Dawson R (1999). Kainic acid (KA)-induced seizures in Sprague-Dawley rats and the effect of dietary taurine (TAU) supplementation or deficiency. *Amino Acids*, 16: 133 - 47.
55. Evans JH y Quick DT (1966). Polyacrylamide gel electrophoresis of spinal fluid proteins in neurological disorders. *Arch Neurol*, 14: 64-72.
56. Feany MB, Anthony DC, Frosch MP, Zane W, De Girolami U (2001). August 2000: Two cases with necrosis and hemorrhage in the putamen and white matter. *Brain Pathol* 11(1): 121 - 22, 125.
57. Finkelstein Y y Vardi J (2002). Progressive Parkinsonism in a Young Experimental Physicist Following Long-Term Exposure to Methanol. *Neurotoxicology*, 23: 521 - 25.
58. Fiskerstrand T, Uel PM y Refsum H (1997). Folate Depletion Induced by Methotrexate Affects Methionine Synthase Activity and its Susceptibility to Inactivation by Nitrous Oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, 282: 1305 - 11.
59. Fishman RA. *Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system*, 2nd edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 62 – 68, 1992.

60. Fukuyama Y, Ochiai Y (1982). Therapeutic trial by taurine for intractable childhood epilepsies. *Brain Dev*, 4: 63 - 69.
61. Gaull GE (1989). Taurine in pediatric nutrition. Review and update. *Pediatrics*, 83: 433 – 42.
62. Gay J, Porrata C, Hernández M, Clua AM, Arguelles JM, Cabrera A, Silva LC (1995). Dietary factors in epidemic neuropathy on the Isle of Youth, Cuba. *Bull-Pan-Am-Health-Organ*, 29: 25 - 36.
63. Golnik KC, Schaible ER (1994). Folate responsive optic neuropathy. *J Neuroophthalmol*, 14: 163 – 169.
64. González Marrero HJ. Neuropatía óptica epidémica. Estudio de 358 pacientes en la provincia de Pinar del Río. Trabajo para optar por el título de especialista de 1er grado en Neurología. INN, 1994.
65. González-Quevedo A, Fernández R, Alfaro I, del Pino M, Serrano C, Luis S, Santiesteban R. Diagnóstico bioquímico de la neuropatía epidémica. Taller de Neuropatía Periférica. Hospital Calixto García, C. de la Habana, 1993.
66. Gloor SM, Wachtel M, Bolliger MF, Ishihara H, Landmann R, Frei K (2001). Molecular and cellular permeability control at the blood–brain barrier. *Brain Res Rev*, 36: 258 – 264.
67. Gucuyener K, Atalay Y, Aral YZ, Hasanoglu A, Turkyilmaz C, Biberoglu G (1999). Excitatory amino acids and taurine levels in cerebrospinal fluid of hypoxic ischemic encephalopathy in newborn. *Clin Neurol Neurosurg*, 101: 171 - 74.
68. Guérin P, Mouatassim SE, Ménézo Y (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7: 175 - 89.
69. Hageman G, van der Hoek J, van Hout M, van der Laan G, Steur EJ, de Bruin W, Herholz K. (1999): Parkinsonism, pyramidal signs, polyneuropathy, and cognitive decline after long-term occupational solvent exposure. *J Neurol*, 246: 198 - 206.

70. Hartung HP, van der Meché FGA; Pollard JD (1998). Guillain-Barré syndrome, CIDP and other chronic immune-mediated neuropathies. *Curr Opin Neurol*, 11: 497 - 513.
71. Hayasaka Y, Hayasaka S, Nagaki Y (2001). Ocular changes after intravitreal injection of methanol, formaldehyde or formate in rabbits. *Pharmacol & Toxicol*, 89: 74 – 78.
72. Head KA (1999). Natural therapies for ocular disorders, part one: diseases of the retina. *Altern Med Rev*; 4: 342 - 59.
73. Hirano M, Cleary JM, Stewart AM, Lincoff NS., Odel JG, Santiesteban R, Luis RS (1994). Mitochondrial DNA mutations in an outbreak of optic neuropathy in Cuba. *Neurology*, 44: 843 - 845.
74. Huxtable R (1989). Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Prog Neurobiol*, 32: 471 - 533.
75. Imaki H, Neuringer M. y Sturman J (1996). Long-term effects on retina of Rhesus monkeys fed taurine-free human infant formula *Adv Exp Med Biol*, 403: 351 – 360.
76. Ingemansson SO. (1983) Studies on the effect of 4-methylpyrazole on retinal activity in the methanol poisoned monkey by recording the electroretinogram. *Acta Ophthalmol Suppl.*, 158: 1 - 24.
77. Ingemansson S (1984) Clinical observations on ten cases of poisoning with particular reference to ocular manifestations. *Acta Ophthalmol*. 62: 15 – 24.
78. Iuvone P.M. (1986). Neurotransmitters and neuromodulators in the retina: regulation, interactions and cellular effects. En: *The Retina: A model for cell biology studies*. Part II. Ed. Adler & Farber, Academic Press, 1 – 69.
79. Jaffé E, Obregón F, Rebrig C, Lima L (1998). Plasma amino acids in children under two years of age with severe undernutrition. Increase of taurine in Kwashiorkor. *Nutr. Neurosc.* 1: 243 – 250.

80. Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Gómez P, Vargas C, de Bustos F, Benito-Leon J, Tallon-Barranco A, Orti-Pareja M, Gasalla T, Arenas J (1998). Neurotransmitter amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 105: 269-77.
81. Johns DR, Neufeld MJ, Hedges TR (1994). Mitochondrial DNA mutations in Cuban optic and peripheral neuropathy. *J. Neuroophthalmol*, 14 : 135 -140.
82. Johlin FC, Swain E, Smith C, Tephly TR (1989). Studies on the mechanism of methanol poisoning: purification and comparison of rat and human liver 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *Mol. Pharmacol.*, 35 (6): 745 – 750.
83. Kaakkola S, Marnela KM, Oja SS, Icen A, Palo J (1990). Leukocyte glutamate dehydrogenase and cerebrospinal fluid amino acids in late onset ataxias. *Acta Neurol Scand*, 82: 292 – 96.
84. Kalloniatis M. y Tomisich G. (1999). Amino acid Neurochemistry of the Vertebrate Retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18: 811 – 866.
85. Kaneda K, Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Maeda T, Kaneko S, Akaike A (1997). Effects of B vitamins on glutamate-induced neurotoxicity in retinal cultures. *Eur J Pharmacol*, 322: 259 - 64.
86. Kendler, B.S. (1989) Taurine: an overview of its role in preventive medicine. *Prev. Med.* 18, 79 - 100.
87. Keys SA, Zimmerman WF (1999). Antioxidant activity of retinol, glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. *Exp Eye Res*, 68: 693 - 702.

88. Kostulas VK (1985). Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Methodological and clinical aspects. *Acta Neurol Scand*, 72: 100 - 112.
89. Koyama I, Nakamura T, Ogasawara M, Nemoto M y Yoshida T (1992). The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by the oxygen radical. *Adv Exp Med Biol*, 315: 355 - 359.
90. Kremer JM, Galivan J. Streckfuss A, Kamen B (1986). Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum*, 29: 832 - 35.
91. Kretschmer BD, Schmidt WJ, Kostrzewa RM, Herrera-Marschitz M. (2002) Amino acids in neurobiology: Neuroprotective and neurotoxic aspects of amino acids involved in neurotransmission and neuromodulation –General Introduction. *Amino Acids* 23: 1–7.
92. Kubrusky RCC, de Mello MCF, de Mello FG (1998). Aspartate as a selective NMDA receptor agonist in cultured cells from avian retina. *Neurochem Int*, 32: 47 – 52.
93. Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, 364:535-537.
94. Lago PM, Guzman MG, Sarmiento L, Perez AB, Alvarez M, Capo V, Avalos I, Flores GK (2001). Mechanism of enterovirus involvement in epidemic neuropathy: hypothesis regarding pathophysiology. *Med Hypotheses*, 56: 339 - 47.
95. Lake, N (1988). Taurine depletion leads to loss of rat optic nerve axons. *Vision Res.* 28, 1071 - 76.

96. Lake, N, De Marte L (1988) Effects of β -alanine treatment on the taurine and DNA content of the rat heart and retina. *Neurochemistry Research* 13, 1003 - 06.
97. Lee EW, Garner CD, Terzo TS (1994). A rat model manifesting methanol-induced visual dysfunction suitable for both acute and long-term exposure studies. *Toxicol & Appl. Pharmacol*, 23: 199 - 206.
98. Levin LA, Gordon LK (2002). Retinal ganglion cell disorders: types and treatments. *Prog Retin Eye Res*, 21: 465 – 484.
99. Li W, Zhing T, Wang J, Altura BT y Altura BM (1999). Methanol elevates cytosolic calcium ions in cultured canine cerebral vascular smooth muscle cells: possible relation to CNS toxicity. *Alcohol*, 18: 221 – 224.
100. Lima L., Matus P, Drujan B (1989). Spatial distribution of glutamate, taurine and GABA in teleosts and mammals retina: In vivo and in vitro study. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7, 295 – 300.
101. Lima L., Matus P, Drujan B. The trophic role of taurine in the retina. A possible mechanism of action. En: *Taurine*, ed J.B. Lombardini et al, Plenum Press, NY, p. 287 – 293, 1992.
102. Lima L, Jaffé E (1998). Plasma concentration of taurine is higher in malnourished than control children: differences between kwashiorkor and marasmus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 442: 487 - 94.
103. Lima, L. (1999) Taurine and its trophic effects in the retina. *Neurochem. Res.* 2: 1333 - 38.
104. Link H (1976). The value of cerebrospinal fluid immunoglobulin analysis in clinical neurology. *Riv. Pat. Nerv. Ment.*, 97: 323 - 40.
105. Llanos G (1993). Epidemic neuropathy in Cuba. *Epidemiological Bull. PAHO*, 14: 1 – 4.

106. Lombardini JB. Review: Recent studies on taurine in the central nervous system. En: Taurine. New York: Plenum Press, 245 – 51, 1992.
107. Lourenco R, Camilo ME (2002). Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. Nutr Hosp, 17: 262-70.
108. Lowry OH, Rosebrough RJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265 - 275.
109. Lu P, Xu W, Sturman, JA (1996). Dietary β -alanine results in taurine depletion and cerebellar damage in adult cats. J Neurosci Res, 43: 112 - 19.
110. Macías-Matos C, Rodríguez A, Chi N, Jiménez S, Zulueta D, Bates CJ (1996). Biochemical evidence of thiamine depletion during the Cuban neuropathy epidemic, 1992 - 1993. Am J Clin Nutr, 64: 347 - 53.
111. Madan D (1898). Notas sobre una forma sensitive de neuritis periférica. Ambliopía por neuritis óptica retrobulbar. Crónica Médico quirúrgica de La Habana, 24: 81 – 86.
112. Maes M, Verkerk R, Vandoolaeghe E, Lin A, Scharpé S (1998). Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsibility. Acta Psychiatr Scand, 97: 302 – 08.
113. Makar AB, Tephly TR (1977). Methanol poisoning. VI. Role of folic acid in the production of methanol poisoning in the rat. J. Toxicol Environ Health, 2: 1201 – 1209.
114. Makar AB, Tephly TR (1982). Improved estimation of formate in body fluids and tissues. Clin Chem, 28: 385.

115. Mancini G, Carbonara AO, y Heremans JF (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2: 235 - 254,
116. Martinasevic MK, Green MD, Baron JQ y Tephly TR (1996). Folate and 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in human and rat brain: relation to methanol toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141: 373 – 381.
117. Mas-Bermejo P, Del Puerto Quintana C, Barcelo Pérez C, Molina Esquivel E, Cañas Pérez R (1995). Case-control study of epidemic optic neuropathy in Cuba, 1993. *Bol Oficina Sanit Panam*, 118: 115 - 26.
118. Más P, Pelegrino JL, Guzman MG, Comellas MM, Resik S, Alvarez M, Rodríguez R, Mune M, Capo V, Balmaseda A, Rodríguez L, Rodríguez MP, Handy J, Kourí G. y Llop A. (1997) Viral isolation from cases of epidemic neuropathy in Cuba. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121, 825 - 33.
119. Más Lago P (1998). Epidemic neuropathy. An etiopathogenic hypothesis. *Rev. Cubana Med. Trop.* 50 (Supl): 259 - 63.
120. Masland RH (2001). Neuronal diversity in the retina. *Curr Op Neurobiol*, 11: 431 – 436.
121. McCarty MF. (1996). Magnesium taurate and fish oil for prevention of migraine. *Med Hypotheses*, 47: 461 - 66.
122. Meyer RJ, Beard MEJ, Ardagh MW, Henderson S (2000). Methanol poisoning. *N Z Med J*, 113: 11 - 13.
123. Mijanovic M, Valjevac K, Lekic M.(1996). The effect of taurine and saline on neuroactive amino acid levels in the mouse brain. *Int Soc Neurochem*, 66 (Supl 2): 102.
124. Militante JD y Lombardini JB (1999). Stimulatory effect of taurine on calcium ion uptake in rod outer segments of the rat retina is independent of taurine uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 291: 383 – 89.
125. Militante JD, Lombardini JB (2002). Taurine: Evidence of physiological function in the retina. *Nutr Neurosc*, 5: 75 - 90.

126. Mori M, Gähwiler BH y Gerber U (2002). β -Alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, 539: 191–200.
127. Newman NJ, Torroni A, Brown MD, Lott MT, Fernández M, Wallace DC (1994). Epidemic neuropathy in Cuba not associated with mitochondrial DNA mutations found in Leber's hereditary optic neuropathy patients. *Am J Ophthalmol*, 118: 158 - 168.
128. Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG, Fuchs PA. *From Neuron to Brain*. 4th Edition. Sinauer Associates Inc, 2001.
129. Niebroj-Dobosz I, Mariam AG, Lukasiuk M, Rafalowska J (1992). Blood-cerebrospinal fluid barrier integrity in cerebral infarction. *Neuropatol Pol*, 30: 29-33.
130. Nobile-Orazio E, Carpo M (2001). Neuropathy and monoclonal gammopathy. *Curr Opin Neurol*, 14: 615 - 20
131. Noseworthy MD, Bray TM (1998). Effect of oxidative stress on brain damage detected by MRI and in vivo ³¹P-NMR. *Free Radic Biol Med*, 24: 942 – 51.
132. Okada M, Okuma Y, Osumi Y, Nishihara M, Yokotani K, Ueno H (2000). Neurotransmitter contents in the retina of RCS rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238: 998 – 1001.
133. Oluwole OS, Onabulu AO, Link H, Rosling H (2000). Persistence of tropical ataxia neuropathy in a Nigerian community. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 69 (1): 96 – 101.
134. Orozco G, Estrada R, Perry TL, Araña J, Fernández R, González-Quevedo A, Galárraga J, Hansen S (1989). Dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy from Eastern Cuba. Clinical, neuropathological and biochemical findings *J. Neurol. Sci.*, 93: 37 – 52.

135. Osuntokun BO, Durowoju JE, Mc Farlane H, Wilson J (1968). Plasma amino acids in the Nigerian nutritional ataxia neuropathy. *Br Med J*, 3 (619): 647 - 49.
136. Osuntokun BO, Osuntokun O (1971). Tropical amblyopia in Nigerians. *Am J Ophthalmol*, 72: 708 -12.
137. Papadopoulus NM, Costello R, Kay AD, Cutler NR, Rapoport SI (1984). Combined immunochemical and electrophoretic determinations of proteins in paired serum and cerebrospinal fluid samples. *Clin Chem*, 30: 1814 -16.
138. Pasantes-Morales H, Quesada O, Cárabez A, Huxtable RJ (1983) Effects of the taurine transport antagonist, guanidinoethane sulfonate, and β -alanine on the morphology of rat retina. *J Neurosci Res* 9, 135 - 143.
139. Pasantes-Morales H, Ochoa de la Paz LD, Sepúlveda J, Quesada O (1999). Amino acids as osmolytes in the retina. *Neurochem Res*, 24: 1339-46.
140. Pasantes-Morales H, Quiroz H, Quesada O (2002). Treatment with taurine, diltiazem, and vitamin E retards the progressive visual field reduction in retinitis pigmentosa: a 3-year follow-up study. *Metab Brain Dis*, 17(3): 183 - 97.
141. Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK (2001). Antioxidant effects of alfa-tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*, 162: 81-88.
142. Paul SM (2000). GABA and glycine. In: *Psychopharmacology, The Fourth Generation of Progress* On Line Edition (<http://www.acnp.org>).

143. Pérez Cristiá R, Fleites Mestre P. Análisis y discusión de la hipótesis tóxico-nutricional como posible causa de la neuropatía epidémica. En: *Neuropatía epidémica en Cuba 1992-1994*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, pp. 117 – 158, 1995.
144. Pérez Cristiá R. Programa de investigaciones “SECUBA”. *Neuropatía epidémica y estrés oxidativo*. Población estudiada, metodología y lógica de trabajo. Reunión de *Neuropatía Epidémica*. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 26 de mayo de 1998.
145. Pérez de Alejo JL, Céspedes A, Fernández Y, Almeyda N. (1994) Aminoácidos plasmáticos en pacientes con neuropatía epidémica diagnosticados en Cuba. *Rev Cubana Oftalmol*; 7: 53 - 9.
146. Pérez Rodríguez A, Isla García A, Fernández I, Mas Mago P, García Rodríguez AI, Rodríguez Concepción A (1998). Posibles factores asociados con la neuropatía epidémica en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 50: 54 – 60.
147. Perry TL, Currier RD, Hansen S y MacLean J. (1977). Aspartate-aurine imbalance in dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy. *Neurology* 27, 257 - 261.
148. Perry TL. Levels of glutamine, glutamate and GABA in CSF and brain under pathological conditions. In: *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System*. Alan R. Liss Inc, 581 - 94, 1983.
149. Plant GT, Mtanda AT, Arden GB, Johnson GJ (1997). An epidemic of optic neuropathy in Tanzania: characterization of the visual disorder and associated peripheral neuropathy. *J Neurol Sci*, 145: 127 - 40.
150. Plaziac C, Lachapelle P, Casanova C (2003). Effects of methanol on the retinal function of juvenile rats. *Neurotoxicology*, 24: 255 – 60.

151. Poduslo JF, Curran GL, Dyck PJ (1988). Increase in albumin, IgG, and IgM blood-nerve barrier indices in human diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* :85: 4879 - 83.
152. Pokroy R, Modi G, Saffer D (2001). Optic neuritis in an urban black African community. *Eye*, 15: 469-73.
153. Poon R, Chu I, Bjarnason S, Potvin M, Vincent R, Miller RB, Valli VE (1994). Inhalation toxicity study of methanol, toluene and methanol/toluene mixtures in rats: effects of 28-day exposure. *Toxicol Ind Health* 10: 231 – 245.
154. Porrata C, Abreu M, Hernández M, Gay J, Hevia G, Márquez H. (1995) Asociación de la ingestión de aminoácidos esenciales y la neuropatía epidémica en la Isla de la Juventud. *Rev Cubana Aliment Nutr*, 9: 16 - 22.
155. Poser CM. An atlas of multiple sclerosis. The Parthenon Publishing Group, New York – UK, 1998.
156. Pow DV (2001). Amino acids and their transporters in the retina. *Neurochem Int*, 38: 463 – 484.
157. Qureshi GA, Baig MS (1988). Quantitation of free amino acids in biological samples by high performance liquid chromatography. Application of the method in evaluating amino acid levels in cerebrospinal fluid and plasma of patients with multiple sclerosis. *J Chromatogr*, 459: 237 – 244.
158. Ramírez Márquez A, Más Bermejo P, Mes Ridel G. Síntesis de los principales aspectos y manejo de la neuropatía epidémica. En: *Neuropatía Epidémica en Cuba 1992-1994*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 19 – 33, 1995.
159. Reeds PJ (2000). Dispensable and Indispensable amino acids for humans. *J Nutr* 130: 1835S—1840S.

160. Reiber H y Peter JB (2001). Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci*, 184: 101–122.
161. Reynolds SF, Blass JP (1975). Normal levels of acetylcoenzyme A and of acetylcholine in the brains of thiamine deficient rats. *J Neurochem*, 24: 185.
162. Rodríguez MP, Álvarez R, García del Barco D, López-Saura P, Hernández F, Labarta V, (1998) et al. Characterization of virus isolated from the cerebrospinal fluid of patients with epidemic neuropathy. *Ann Trop Med Parasitol*, 92: 97 - 105.
163. Rodríguez-Hernández M, Hirano M, Naini A, Santiesteban R (2001). Biochemical studies of patients with Cuban epidemic neuropathy. *Ophthalmic Res*, 33: 310-13.
164. Rodríguez-Ojea A, Macías C, Jiménez S, Cabrera A, Bacallao J, Jiménez EA, Reyes D, y Herrera D (1998). Evaluación del estado nutricional de enfermos con neuropatía epidémica al año de evolución. Indicadores bioquímicos. *Rev Cubana Med Trop*, 50: 254 - 258.
165. Rodríguez-Ojea A, Jiménez S, Martín I, Bacallao J, Moreno R, Romero MC (2000) .Evaluación antropométrica y de la dieta de enfermos de neuropatía epidémica al año de evolución. *Rev Cubana Aliment Nutr*, 14: 86 – 93.
166. Román GC (1994) An epidemic in Cuba of optic neuropathy, sensorineural deafness, peripheral sensory neuropathy and dorsolateral myeloneuropathy. *J Neurol Sci*, 127: 11 - 28.
167. Román G (1998). Tropical myeloneuropathies revisited. *Curr Opin Neurol*, 11: 539 – 544.

168. Román G (1998). Epidemic neuropathy in Cuba: a public health problem related to the Cuban Democracy Act of the United States. *Neuroepidemiology*, 17: 111 – 115.
169. Sadun AA, Martone JF, Muci-Mendoza R, Reyes L, Dubois L, Silva JC, Román G, Caballero B (1994). Epidemic optic neuropathy in Cuba. Eye findings. *Arch Ophthalmol*, 112: 691 - 699.
170. Sadun A.A. (1998). Acquired mitochondrial impairment as a cause of optic nerve disease. *Tr Am Ophth Soc*, 96: 881 – 923.
171. Sadun AA (2002). Mitochondrial optic neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 72: 423-425.
172. Santiesteban R. Epidemias y endemias de neuropatía en Cuba. Editorial Ciencias Médicas. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. C. Habana, Cuba, 1997.
173. Santiesteban R, Rodríguez M, Hirano M, Francisco M, Mendoza C, Carrer M, Méndez I, Serrano C, Luis S (1999). Neuropatía óptica hereditaria de Leber y su posible relación con la epidemia de neuropatía en Cuba. *Rev Neurol*, 29: 289 - 96.
174. Saransaari P, Oja SS (1999). Characteristics of ischemia-induced taurine release in the developing mouse hippocampus. *Neuroscience*, 94: 949 -54.
175. Saransaari P, Oja SS (2000). Involvement of metabotropic glutamate receptors in ischemia-induced taurine release in the developing and adult hippocampus. *Neurochem Res*, 25: 1076 - 72.
176. Saransaari P, Oja SS (2003). Characterization of N-methyl-D-aspartate-evoked taurine release in the developing and adult mouse hippocampus. *Amino Acids*, 24: 213–221.

177. Satsu H, Kobayashi Y, Yokoyama T, Terasawa E, and Shimizu M (2002). Effect of dietary sulfur amino acids on the taurine content of rat tissues. *Amino Acids*, 23: 447 – 452.
178. Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM (1999a). Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26: 11 – 19.
179. Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM (1999b). Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26: 85 – 91.
180. Scarpini E, Galimberti D, Baron P, Clerici R, Ronzoni M, Conti G, Scarlato G (2002). IP-10 and MCP-1 levels in CSF and serum from multiple sclerosis patients with different clinical subtypes of the disease. *Journal of the Neurological Sciences* 195: 41– 46.
181. Schalinske K.L., Steele R.D. (1996). Methotrexate alters carbon flow through the hepatic folate-dependent one-carbon pool in rats. *Carcinogenesis*, 17: 1695 - 1700.
182. Seme MT, Summerfelt P, Henry MM, Neitz J y Eells JT (1999) Formate-induced inhibition of photoreceptor function in methanol intoxication. *J. Pharmacol Exp Ther*, 289: 361 – 370.
183. Seme MT, Summerfelt P, Neitz J, Eells JT, Henry MM (2001). Differential recovery of retinal function after mitochondrial inhibition by methanol intoxication. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42: 834-41.
184. Seyfert S, Kunzmann V, Schwertfeger N, Koch HC, Faulstich A (2002). Determinants of lumbar CSF protein concentration. *J Neurol* , 249: 1021–1026.

185. Siegel GJ, BW Agranoff, RW Albers, SK Fisher, MD. Uhler. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, 6th ed. Lippincott-Raven Publishers, 1999.
186. Sigarroa A. Biometría y diseño experimental. Ministerio de Educación Superior. Ed Pueblo y Educación, La Habana, 1985.
187. Simonian NA y Coyle JT (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36: 83 – 106.
188. Skvortsova VI, Raevskii KS, Kovalenko AV, Kudrin VS, Malikova LA, Sokolov MA, Alekseev AA, Gusev EI (1999). Levels of neurotransmitter amino acids in the cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*;99: 34 - 8.
189. Smith, I. Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol.II: Zone electrophoresis. Pitman Press, Great Britain, pp.369 – 383, 1968.
190. Spreux-Varoquax O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le Forestier N, Marouan A, Dib M, Meininger V (2002). Glutamate levels in the cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci*, 193: 73 – 78.
191. Stapleton PP, O'Flaherty L, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ (1998). Host defense - a role for the amino acid taurine? *J Parenter Enteral Nutr*, 22: 42 - 8.
192. Starr JM, Wardlaw J, Ferguson K, MacLulich A, Deary IJ, Marshall I (2003). Increased blood–brain barrier permeability in type II diabetes demonstrated by gadolinium magnetic resonance imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiat*, 74: 70 – 76.
193. Statsoft Inc. (2000). STATISTICA for Windows. Computer Program Manual. <http://www.statsoft.com>.

194. Stover JF, Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Lowitzsch K, Kempinski OS (1997). Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Eur J Clin Invest*, 27: 1038 – 43.
195. Stover JF, Unterberg AW (2000). Increased cerebrospinal fluid glutamate and taurine concentrations are associated with traumatic brain edema formation in rats. *Brain Res*, 875: 51 - 55.
196. Strony LP, Wagner K, Keshgegian AA (1982). Demonstration of cerebrospinal fluid oligoclonal banding in neurologic diseases by agarose gel electrophoresis and immunofixation. *Clin Chim Acta*, 122: 203 - 12.
197. Sturman, JA y Messing JM (1996). Depletion of feline taurine levels by β -alanine and dietary taurine restriction. *Nutr Res*, 16: 789 - 795.
198. Sun H, Crossly WJ (2000) Quantitative assessment of localization and colocalization of glutamate, aspartate, glycine and GABA immunoreactivity in the chick retina. *Anat Rec*, 260: 158 – 179.
199. Suzuki T, Suzuk T, Wada T, Saigo K, Watanabe K (2002). Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J*, 21: 6581 - 89.
200. Takeoka T, Shinohara Y, Furumi K, Mori K (1980). Characteristic protein fractions of cerebrospinal fluid disc electrophoretic analysis. *Brain Res* 198: 147 - 156.
201. Thompson EJ. *The CSF proteins: A biochemical approach*, Elsevier, 1988.
202. Tibbling, G; Link, H; Ohman, S (1977). Principles of albumin and IgG analysis in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest*, 37: 385 – 390.

203. Todd K, Butterworth RF (1999). Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. *Ann N Y Acad Sci*, 893: 404 – 11.
204. Tucker K, Hedges TR (1993). Food shortages and an epidemic of optic and peripheral neuropathy in Cuba. *Nutr Rev*, 51: 349 - 357.
205. Tzschentke TM (2002) Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications – An introduction. *Amino Acids*, 23: 147– 152.
206. Van Gelder NM (1978) Taurine, the compartmentalized metabolism of glutamic acid, and the epilepsies. *Can J Physiol Pharmacol*, 56: 362 - 374.
207. Villalobos MA, de la Cruz JP, Cuerda MA, Ortiz P, Smith-Agreda JM, Sánchez de la Cuesta F (2000). Effect of S-adenosylmethionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia-reperfusion. *Brain Res*, 883: 31 - 40.
208. Wallace KB, Eells JT Madeira VM, Cortopassi G, Jones DP (1997). Mitochondria-mediated cell injury. Symposium overview. *Fundam Appl Toxicol*, 38: 23 – 37.
209. Walsh y Hoyt. Retrobulbar toxic and deficiency optic neuropathies. En: *Clinical Neuro-Ophthalmology*, 4th Edition, 1982.
210. Wardlaw JM, Sandercock PAG, Dennis MS, Starr J (2003). Is breakdown of the blood-brain barrier responsible for lacunar stroke, leukoaraiosis, and dementia? *Stroke*, 34: 806 - 812.
211. WHO (World Health Organization). Methanol. *Environmental Health Criteria*; 196. Ed. by World Health Organization, 1997.
212. Worthington BS, Alvares O, Ahmed S (1979). Progressive effects of protein-calorie malnutrition on serum free amino acids in infant and young adult nonhuman primates. *Am J Clin Nutr*, 32: 517 – 29.

213. Young GA, Swanepoel CR, Croft MR, Hobson SM y Parsons FM. (1982) Anthropometric and plasma valine, amino acids, and proteins in the nutritional assessment of hemodialysis patients. *Kidney Int*, 21: 492 - 499.
214. Zheng W (2001). Neurotoxicology of the brain barrier system: new implications. *Clin Toxicol*, 39: 711 – 19.
215. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, New York, 1999.

ANEXO 1

Contenido de aminoácidos (nmoles/mg prot) en retina de ratas de acuerdo a los grupos de tratamiento (m ± es).

Amino-ácidos	Control (n=5)	MeOH (n=4)	MTX (n=6)	MTX-MeOH (n=6)	Taurina (n=4)	Tau-MTX-MeOH (n=4)
Asp	24.7± 8.0	25.1± 4.6	15.2 ± 4.0	27.0 ± 8.2	14.5 ± 0.6	26.1 ± 4.5
Glu	64.9± 2.9	61.6± 15.8	50.5 ± 15.0	70.3 ±19.5	55.7 ± 14.8	61.9 ± 19.6
Asn	3.26± 0.76	3.13± 0.54	2.56 ± 0.32	8.44 ± 0.76	2.92 ± 1.49	3.02 ± 0.83
Ser	3.82 ± 0.27	4.33± 0.91	5.33 ± 1.43	4.54 ± 1.39	2.90 ± 0.89	5.95 ± 1.64
Gln	46.5± 3.6	47.2± 9.9	37.8 ± 10.6	44.0 ± 7.7	33.5 ±7.2	57.0 ± 7.4
Thr	12.8± 2.3	24.5± 9.7	10.5 ± 3.7	15.1 ± 2.1	11.5 ± 2.0	13.5 ± 2.9
Gly	11.9± 1.4	24.3± 8.2	10.5 ±4.7	13.3 ± 3.6	11.7 ± 2.4	19.2 ± 5.4
Arg	15.5± 3.6	13.5± 4.2	13.8 ± 4.3	14.5 ± 4.8	16.7 ± 6.3	15.8 ± 2.0
Ala	16.1± 2.5	22.6± 5.0	19.0 ± 5.5	12.3 ± 4.5	8.5 ± 3.6	13.5 ± 2.8
Tau	374.1± 39.6	367.8 ± 68.0	279.0 ± 89.6	370.3 ± 64.8	363.2 ± 95.2	534.2 ± 138
GABA	8.02 ± 1.94	9.10± 2.39	3.77 ± 1.22	8.07 ± 1.22	5.62 ± 1.50	8.22 ± 2.5
Tyr	ND	ND	ND	ND	ND	ND

MeOH: metanol; MTX: metotrexate; Tau: Taurina 2%
 ND: No detectado

ANEXO 2

Contenido de aminoácidos (nmoles/mg prot) en nervio óptico de ratas tratadas con metanol durante dos semanas (m ± es).

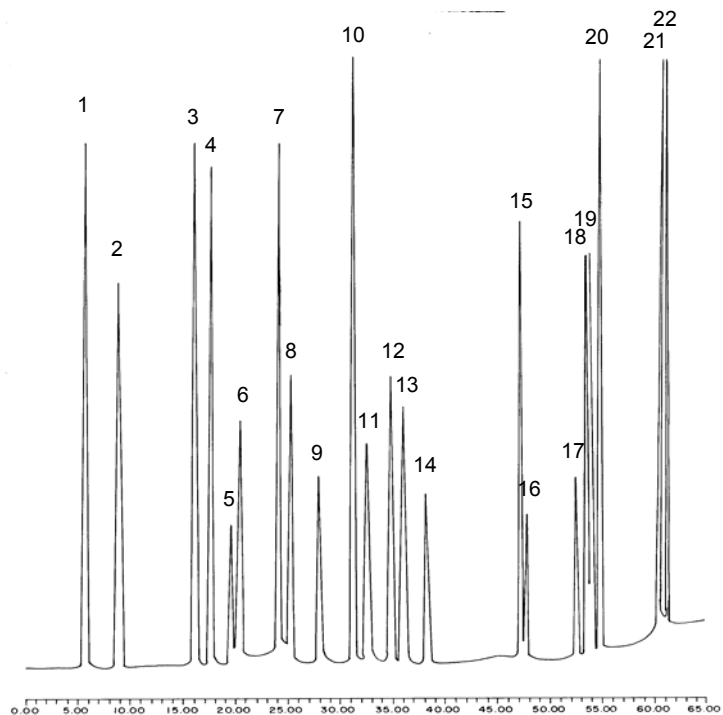
Amino-ácidos	Control (n=5)	MeOH (n=5)	MTX (n=4)	MTX- MeOH (n=5)	Taurina (n=4)	Tau-MTX-MeOH (n=5)
Asp *	26.0 ± 2.0	29.4 ± 4.4	23.3 ± 2.5	35.7 ± 2.2 *	22.5 ± 1.5	34.5 ± 2.6*
Glu	92.8 ± 8.3	90.4 ± 13.5	59.9 ± 8.5	84.0 ± 8.5	51.1 ± 13.2	82.8 ± 9.6
Asn	5.16 ± 0.97	5.7 ± 1.75	3.89 ± 0.79	4.48 ± 0.85	3.63 ± 1.4	5.9 ± 0.94
Ser	36.8 ± 2.9	47.4 ± 11.9	32.4 ± 5.9	53.1 ± 6.7	31.6 ± 3.2	55.3 ± 8.9
Gln	101.3 ± 8.9	81.4 ± 24.4	105.3 ± 6.3	99.8 ± 10.1	82.6 ± 11.8	104.4 ± 14.0
Thr	16.7 ± 3.8	13.7 ± 2.6	10.6 ± 2.5	18.5 ± 4.0	15.3 ± 2.6	22.0 ± 5.4
Gly	18.7 ± 2.4	18.1 ± 2.8	16.6 ± 2.6	20.8 ± 3.1	17.8 ± 1.6	24.4 ± 2.9
Arg	30.6 ± 3.1	34.4 ± 4.6	25.3 ± 5.0	41.5 ± 10.2	34.1 ± 1.5	43.4 ± 3.3
Ala	44.3 ± 8.1	44.3 ± 8.1	43.9 ± 10.7	41.2 ± 6.3	38.9 ± 2.2	47.4 ± 5.7
Tau	89.8 ± 11.6	81.3 ± 20.1	96.8 ± 15.3	77.5 ± 8.3	68.6 ± 8.4	88.4 ± 20.2
GABA	8.68 ± 1.0	2.53 ± 1.62	3.28 ± 1.42	3.01 ± 0.68	1.75 ± 0.08	2.36 ± 0.96
Tyr	25.9 ± 5.0	14.5 ± 7.3	30.1 ± 4.6	14.4 ± 5.4	14.01 ± 3.70	25.85 ± 4.04

MeOH: metanol; MTX: metotrexate; Tau: Taurina 2%

* ANOVA: $F_{(5,28)} = 4.684$; $p < 0.01$.

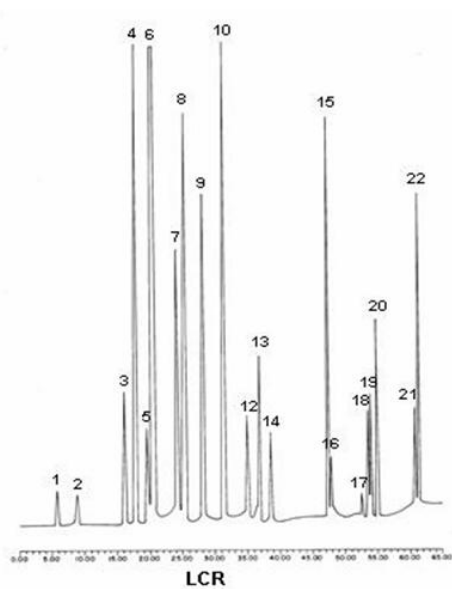
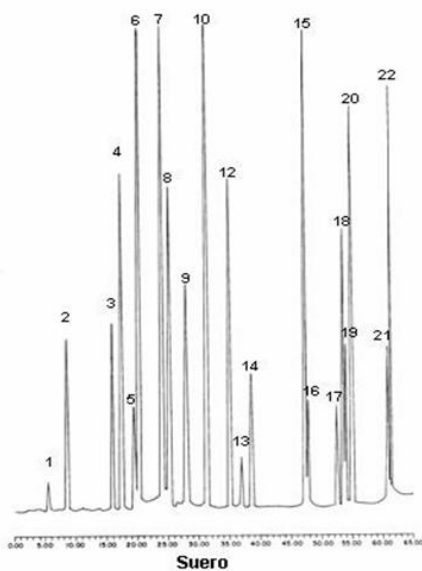
Prueba de Duncan: MTX-MeOH y Tau-MTX-MeOH vs Control: $p = 0.013$

ANEXO 3



Cromatograma de aminoácidos. Estándar (1 mg/ml de cada aminoácido).
Prederivatización con aldehído orto-ftálico. (OPA). Vol de inyección: 15 μ l
1. Aspartato, 2. Glutamato, 3. Asparagina, 4. Serina, 5. Histidina, 6. Glutamina,
7. Glicina, 8. Treonina, 9. Arginina, 10. Alanina, 11. Hipotaurina, 12. Taurina, 13. Acido γ -aminobutírico, 14. Tirosina, 15. Valina, 16. Metionina, 17. Triptofano, 18. Isoleucina, 19. Fenilalanina, 20. Leucina, 21. Ornitina, 22. Lisina

ANEXO 4

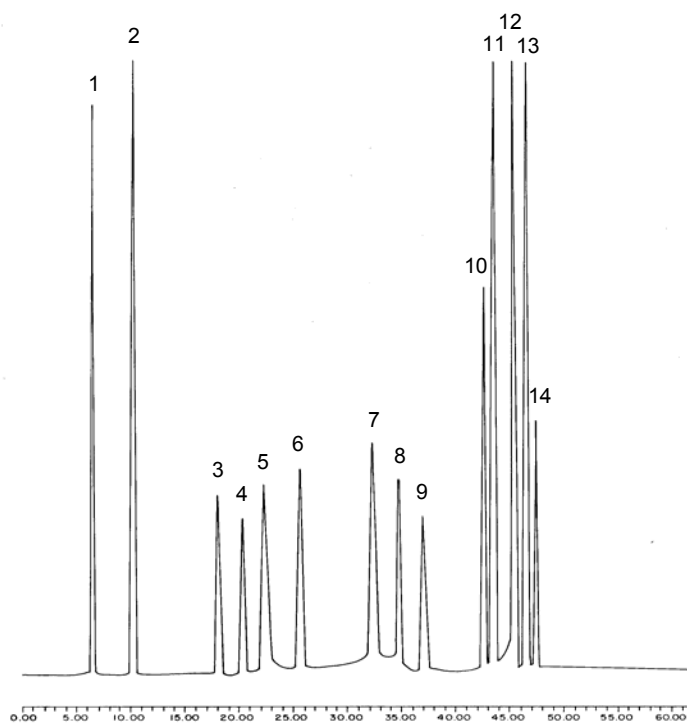


Cromatogramas de aminoácidos. Suero y LCR. Prederivatización con OPA.

Vol de inyección: 10 y 15 μ l, respectivamente

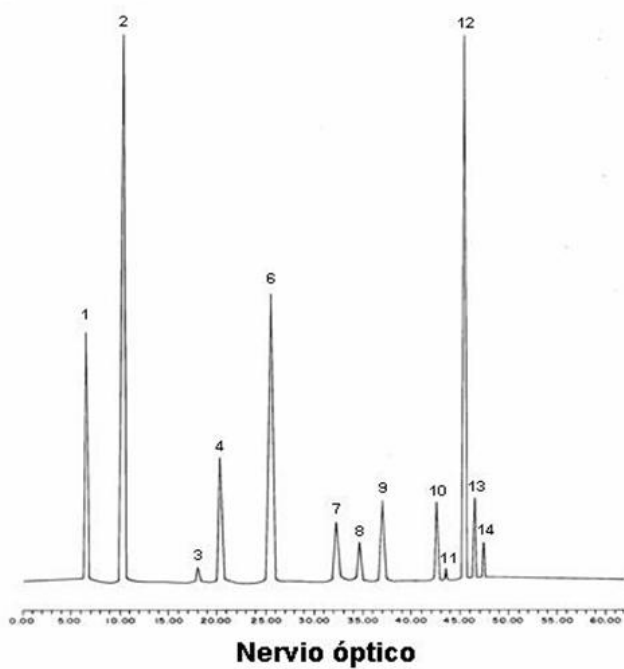
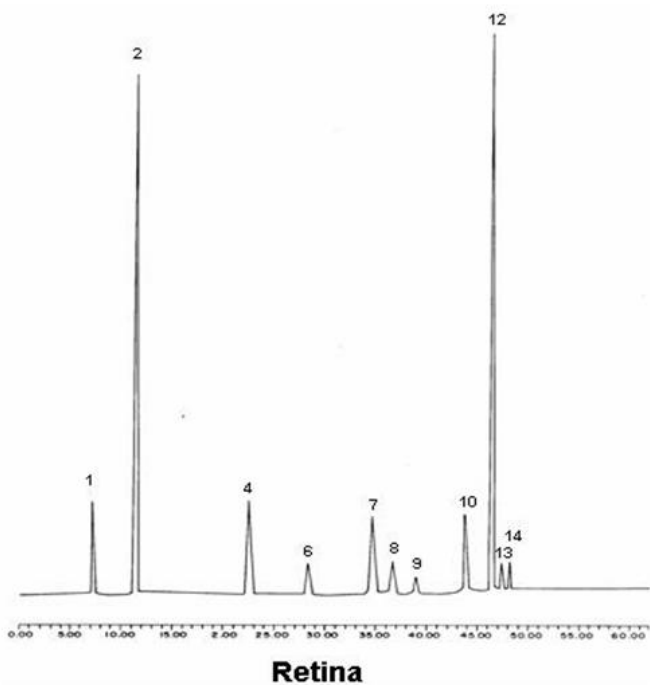
1. Aspartato, 2. Glutamato, 3. Asparagina, 4. Serina, 5. Histidina, 6. Glutamina, 7. Glicina, 8. Treonina, 9. Arginina, 10. Alanina, 11. Hipotaurina, 12. Taurina, 13. Acido γ -aminobutírico, 14. Tirosina, 15. Valina, 16. Metionina, 17. Triptofano, 18. Isoleucina, 19. Fenilalanina, 20. Leucina, 21. Ornitina, 22. Lisina

ANEXO 5



Cromatograma de aminoácidos. Estándar (1 mg/ml de cada aminoácido)
Prederivatización con OPA. Vol de inyección: 15 μ l
1. Aspartato, 2. Glutamato, 3. Asparagina, 4. Serina, 5. Histidina, 6. Glutamina,
7. Glicina, 8. Treonina, 9. Arginina, 10. Alanina, 11. Hipotaurina, 12. Taurina,
13. Acido γ -aminobutírico, 14. Tirosina

ANEXO 6

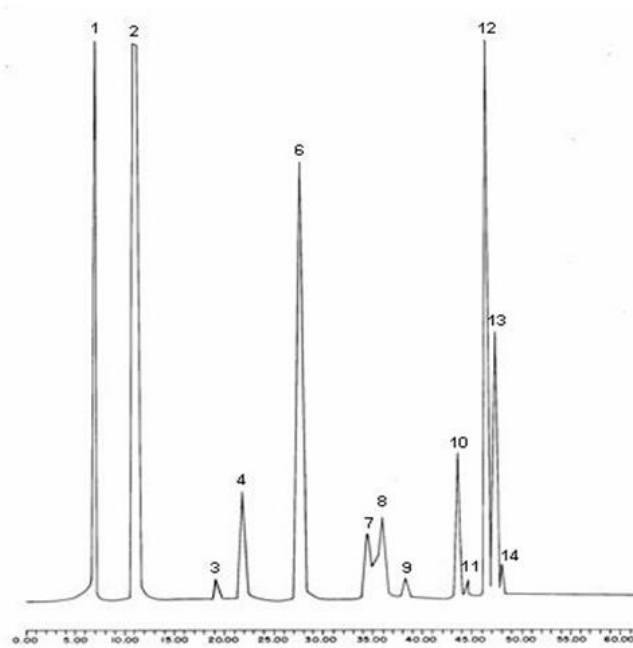


Cromatogramas de aminoácidos. Retina y nervio óptico.

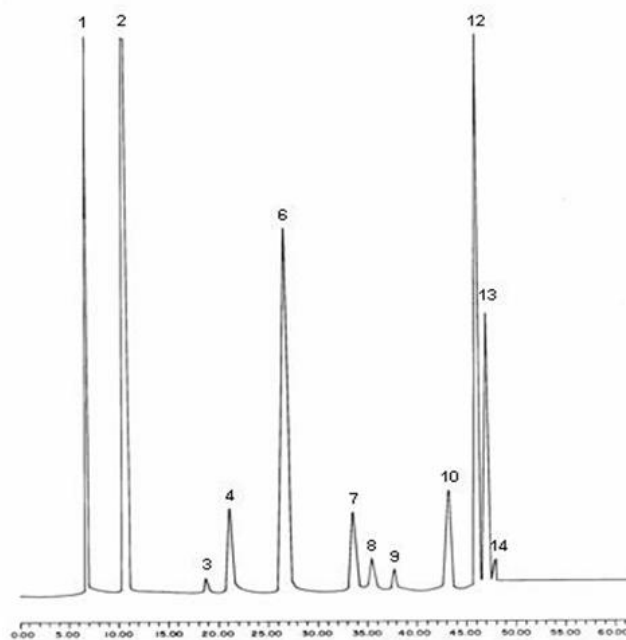
Prederivatización con OPA. Vol de inyección: 10 μ l

1. Aspartato, 2. Glutamato, 3. Asparagina, 4. Serina, 5. Histidina, 6. Glutamina, 7. Glicina, 8. Treonina, 9. Arginina, 10. Alanina, 11. Hipotaurina, 12. Taurina, 13. Acido γ -aminobutírico, 14. Tirosina

ANEXO 7



Hipocampo



Corteza posterior

Cromatogramas de aminoácidos. Hipocampo y corteza posterior.

Prederivatización con OPA. Vol de inyección: 5 μ l

1. Aspartato, 2. Glutamato, 3. Asparagina, 4. Serina, 5. Histidina, 6. Glutamina, 7. Glicina, 8. Treonina, 9. Arginina, 10. Alanina, 11. Hipotaurina, 12. Taurina, 13. Acido γ -aminobutírico, 14. Tirosina

ANEXO 8

Publicaciones y eventos relacionados con la tesis:

1. Alfaro I, **González-Quevedo A**, del Pino M, Serrano C, Lara R, González H, de la Portilla M, Luis S, Santiesteban R (1994). Immunoglobulins in epidemic neuropathy in Cuba J Neurol Sci, 127 (2): 234-235.
2. Eells JT, **González-Quevedo A**, McMartin KE, Sadun AA (1996) Folate deficiency and elevated serum and CSF formate concentrations in patients with Cuban epidemic optic neuropathy. Invest Ophthalmol Visual Sci, 37 (3): 2259.
3. Cabrera JA, **González-Quevedo A**, Alfaro I, Cabrera Núñez JA (1997). Immunological study of CSF in epidemic neuropathy. J Neurol Sci, Suppl vol 150, S 106.
4. Santiesteban R, Pamias E, Luis S, Serrano C, **González-Quevedo A**, Alfaro I, Francisco M, Suárez J (1997). Neuropatía epidémica: proposición y argumentación para renombrar a la enfermedad de Strachan, como de Strachan y Madam. Rev Neurol, 25: 1950 - 56.
5. Santiesteban Freixas R, Luis González S, Serrano C, **González-Quevedo A**, Alfaro Capdegelles I, Francisco Plasencia M. Epidemias y endemias de neuropatía en Cuba. Ed.Ciencias Médicas (CNICM), La Habana, 1997.
6. Luis RS, Santiesteban R, **González-Quevedo A**, Gutiérrez J, Pascual A, Rosich G, Camejo Z (1998). Investigaciones y tareas del INN sobre Neuropatía Epidémica desde el 1er Taller en 1994 hasta la fecha del 2do Taller en 1998. Rev. Cubana Med Trop, 50, suppl: 229 - 30.
7. **González-Quevedo A**, Obregón F, Santiesteban R, Fernández R, Lima L (1998). Los aminoácidos como marcadores bioquímicos en la neuropatía óptica epidémica y endémica. Rev Cubana Med Trop, 50, suppl: 241 – 244.
8. Eells JT, **González-Quevedo A**, Santiesteban R, McMartin KE, Sadun AA (2000). Deficiencia de folato y concentraciones elevadas de formato en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con neuropatía óptica epidémica. Rev Cubana Med Trop, 52 (1): 21 – 23.

9. Santiesteban R, Serrano C, Gutiérrez J, Luis S, **González A**, Francisco M, Rodríguez M, Mendoza M, Santín M (2000). La epidemia de neuropatía en Cuba. Ocho años de estudio y seguimiento. Rev Neurol, 31 (6): 549 - 66.
10. **González-Quevedo A**, Obregón F, Santiesteban R, Fernández R, Lima L (2001). Amino acid levels and ratios in serum and cerebrospinal fluid of patients with optic neuropathy in Cuba. Nutr Neurosci, 4 (1): 51-62.
11. Obregón F, **González-Quevedo A**, Lima L (2001). Efecto de la administración crónica de metanol sobre los niveles de ácido aspártico, ácido glutámico y taurina en retina, nervio óptico e hipocampo de ratas. Acta Científica Venezolana, 52, supl 3: 182.
12. **González-Quevedo A** (2002). Toxicidad por metanol y su efecto sobre las vías visuales. VITAE. Academia Biomédica Digital, No. 12.
ISSN 1317-987X, ISBNpp199902CS1243.
<http://caibco.ucv.ve/Vitae/VitaeDoce/Portada/homevitae.htm>.
13. **González-Quevedo A**, Obregón F, Urbina M, Roussó T, Lima L (2002). Effect of chronic methanol administration on amino acids and monoamines in retina, optic nerve and brain of the rat. Toxicol Appl Pharmacol, 185 (2): 77 – 84.
14. **González-Quevedo A**, Obregón F, Urbina M, Roussó T, Lima L (2003). Effects of taurine deficiency and chronic methanol administration on rat retina, optic nerve and brain amino acids and monoamines. Nutr Neurosci, 6 (4): 253 - 61.

Eventos científicos:

1. **Taller de Neuropatía Periférica. Hospital Calixto García**, C. Habana, 1993.
Diagnóstico bioquímico de la neuropatía epidémica.
2. **Taller Internacional sobre la Neuropatía Epidémica ocurrida en Cuba**. C. de la Habana, 12 - 15 de julio de 1994.
Estudio de las proteínas en LCR y suero en la neuropatía óptica epidémica (Autor).
Estudio inmunológico de pacientes con neuropatía óptica epidémica en Cuba (Coautor).
3. **International Taurine Symposium**. 15-18 de julio, 1997. Tucson, Arizona, USA.
Plasma taurine concentration is decreased in patients with Cuban Optic Neuropathy. Julio, 1997.

4. **XLVII Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (ASOVAC).** 16 - 21 de noviembre, 1997. Valencia, Venezuela.
Neuropatía Óptica epidémica y endémica en Cuba: Aminoácidos en el LCR.
5. **III Congreso Nacional de Patología Clínica.** 17 - 21 de noviembre, 1997. La Habana.
Determinación de la concentración de formiato sanguíneo en un modelo experimental de neuropatía óptica en ratas.
6. **Jornada Anual de Temas Terminados del INN “Prof. Rafael Estrada in Memoriam”.** Marzo 31, 1998.
Los aminoácidos como marcadores bioquímicos en la Neuropatía Óptica Epidémica.
7. **Sesión Científica: “Neuropatía Epidémica”.** Mayo 26, 1998. IPK, C. Habana.
Determinación de taurina en pacientes con Neuropatía Óptica Epidémica.
Concentración de folatos y formiato en suero y LCR de pacientes con neuropatía óptica epidémica.
8. **Simposio Internacional sobre Avances Recientes en Neurología.** CIMEQ, C. Habana, 27 - 31 de julio de 1998.
Concentración plasmática de taurina disminuida en pacientes con neuropatía óptica epidémica cubana (Cartel).
9. **Simposium Internacional “Restauración Neurológica ‘99”.** Centro Internacional de Restauración Neurológica, 23 – 25 de febrero de 1999.
Patrón de aminoácidos y morfología de la retina en ratas tratadas con metanol.
Posible efecto protector de la taurina.
10. **Jornada de Temas Terminados del INN (abril 2000):**
Evaluación bioquímica y morfológica del efecto de la administración crónica de metanol sobre el cerebro, nervio óptico y retina de ratas. Posible efecto protector de la taurina. (Resultados parciales).
11. **30 Reunión Anual de la Sociedad de Neurociencias de Estados Unidos.** New Orleans, La (4 – 9 de noviembre de 2000):
Brain and retinal biogenic amine levels after methanol administration to rats with reduced taurine levels. M. Urbina, F. Obregón, **A. González-Quevedo**, L. Lima (Cartel).
12. **Encuentro Itinerante sobre Enfermedades de los Sistemas Visual y Nervioso Periférico.** C. de la Habana, agosto 2001.

Mesa redonda: Neuropatía Epidémica. Investigaciones Bioquímicas e Inmunológicas. **González-Quevedo A** (Ponencia).

Caracterización de algunas variables bioquímicas en un brote de neuropatía óptica y periférica en la provincia de Matanzas. **González-Quevedo A**, Obregón F, Santiesteban R, Serrano C, Fernández R, González S, Guerra R, Infante S, Lima L. (Cartel).

Attenuation of ERG responses in a rodent model of Cuban Epidemic Optic Neuropathy. J.T. Eells, M.M. Henry, P. Summerfelt, J. Neitz, A.A. Sadun, **A. González-Quevedo** (Ponencia).

13. **LI Convención Anual de AsoVAC**. Universidad Nacional Experimental del Táchira. San Cristóbal, Venezuela, 18 al 23 de noviembre de 2001.
Efecto de la administración crónica de metanol sobre los niveles de ácido aspártico, ácido glutámico y taurina en retina, nervio óptico e hipocampo de ratas. Obregón F, **González-Quevedo A**, Lima L (Ponencia).
14. **Convención de Ciencias Básicas Médicas, Girón 2002**. 14-18 de octubre.
Neuroquímica de la Neuropatía Óptica Epidémica. **González-Quevedo A** (Conferencia)
Efectos de la reducción de taurina sobre los cambios bioquímicos inducidos por la administración de metanol en la retina, nervio óptico y tejido cerebral de ratas. **González-Quevedo A**, Obregón F, Urbina M, Roussó T, Lima L. (Cartel).