



# **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal

Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

## **ESTUDIO DE LOS MARCADORES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DEL PERRO**

BRAIN ENERGY METABOLISM BIOMARKERS IN CANINE  
CEREBROSPINAL FLUID

Córdoba, Noviembre 2020

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Alejandro Seisdedos Benzal**

Directoras:

Alba Galán Rodríguez

María del Mar Granados Machuca

TITULO: *ESTUDIO DE LOS MARCADORES DEL METABOLISMO  
ENERGETICO CEREBRAL EN EL LIQUIDO CEFALORRAQUÍDEO  
DEL PERRO*

AUTOR: *Alejandro Seisdedos Benzal*

---

© Edita: UCOPress. 2021  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---



**TÍTULO DE LA TESIS: ESTUDIO DE LOS MARCADORES DEL  
METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL EN EL LÍQUIDO  
CEFALORRAQUÍDEO DEL PERRO**

**DOCTORANDO/A: ALEJANDRO SEISDEDOS BENZAL**

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**  
(Se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El doctorando Alejandro Seisdedos Benzal inició su formación investigadora, como alumno interno del Departamento de Medicina y Cirugía Animal colaborando en el grupo de investigación, y clínica, como alumno interno del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba (HCV) en el año 2011. En el año 2013 disfrutó de una beca Erasmus en la Universidad de Bolonia y además de eso en dicho año realizó estancias en el Servicio de Neurología del Hospital Veterinario I Portoni Rossi, bajo la supervisión del Prof. Dr. Marco Bernardini. Tras Graduarse en Veterinaria inició los estudios de doctorado incorporándose al Máster en Medicina, Sanidad y Mejora Animal desarrollando su trabajo fin de máster sobre dolor neuropático. Durante ese periodo el doctorando complementó su formación investigadora con la formación clínica al realizar un internado en clínica de pequeños animales en el HCV. Fue en este momento cuando el doctorando inició su actividad como docente, al tener alumnado bajo su supervisión como interno del HCV y colaborando en la impartición de asignaturas del Departamento. Durante este periodo su formación se fue completando con la asistencia a cursos y congresos, en los que participó activamente con la presentación de

comunicaciones orales o pósters. Tras estos años de formación, y debido a su entusiasmo por aprender, habilidades comunicativas y sociales y capacidad de trabajo en equipo, el doctorando fue contratado en el HCV como veterinario, desarrollando fundamentalmente su labor en los servicios de neurología y hospitalización.

El proyecto de Tesis del doctorando se enmarca en el programa de Doctorado de la Universidad de Córdoba correspondiente al área de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias (P. D. con mención de calidad), estando a su vez adscrito a la línea de investigación Anestesia y Cirugía Experimental.

La siguiente Tesis Doctoral, llevada a cabo bajo nuestra supervisión y dirección, se ha desarrollado durante el periodo comprendido entre el año 2015 y el 2020. En todo momento el doctorando ha mostrado una gran dedicación e interés, no sólo en el desarrollo de su Tesis, sino en las funciones docentes, asistenciales e investigadoras (aunque no tuvieran relación directa con su Tesis).

❖ El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ha dado lugar de forma directa a la siguiente producción científica:

- Publicaciones incluidas en el Journal Citation Reports (JCR):
  - Galán-Rodríguez A, Carletti BE, Morgaz-Rodríguez J, Gamito-Gómez A, Muñoz Rascón P, Martín-Suárez EM. (2013) Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations in healthy adult dogs. *Vet Rec* 173(10), 249.
  - Galán A, Carletti BE, Morgaz J, Granados MM, Mesa I, Navarrete R, Lombardo R, Martínez CM, Martín-Suárez EM. (2014) Comparative study of select biochemical markers in cerebrospinal fluid of healthy dogs before and after treatment with nutraceuticals. *Vet Clin Pathol* 43(1), 72-77.
  - **Seisdedos A**, Galán A, Carletti B, Quirós S, Funes F, Martín EM, Domínguez JM, Gómez R, Granados MM. (2019) Anesthetic effects of isoflurane and propofol on cerebrospinal fluid biochemical markers in healthy dogs. *Vet Clin Pathol* 48(2), 270-275.

- Galán A, **Seisdedos A**, Carletti BE, Quirós S, Martín EM, Menor D, Granados MM. (2020) Cisternal versus lumbar cerebrospinal fluid lactate concentration in healthy dogs. *Vet Med (Praha)* 65, 297-300.
- Publicaciones en revistas nacionales:
  - **Seisdedos A**, Galán I, Andrés M, Galán A. (En prensa) Estudio, análisis e interpretación del líquido cefalorraquídeo en el perro (Parte I). Consulta de Difusión Veterinaria.
  - **Seisdedos A**, Galán I, Andrés M, Galán A. (En prensa) Estudio, análisis e interpretación del líquido cefalorraquídeo en el perro (Parte II). Consulta de Difusión Veterinaria.
- Comunicaciones a congresos:
  - Carletti BE, Granados MM, Quirós S, Funes F, Morgaz J, Muñoz-Rascón P, Ruiz P, Herrera M, Galán A. (2014) Evaluación de lactato, glucosa y glutamato en líquido cefalorraquídeo y plasma en perros durante anestesia general con Isoflurano o Propofol. X Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anestesia y Analgesia Veterinaria (SEAAV), Málaga, España.
  - **Seisdedos A**, Galán A, Granados MM. (2018) Influencia del propofol e isoflurano en los marcadores bioquímicos del líquido cefalorraquídeo en perros sanos durante la anestesia. VI Congreso Científicos de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
    - Publicado como “Creando Redes Doctorales. Vol. VI “La Generación del Conocimiento” Universidad de Córdoba 2018, 189-192. ISBN: 978-84-9927-239-9.
- Capítulos de libros:
  - **Seisdedos-Benzal A**, Galán A. Recent advances in brain energy metabolism biochemical markers in canine cerebrospinal fluid. Nova Science Publishers (En prensa)

❖ Otras aportaciones:

- Capítulos de libros:
  - Galán Rodríguez A, **Seisdedos Benzal A**, Martín Suárez, EM. (2019) “Capítulo 6. Ceguera” en Medicina Interna en Pequeños Animales. 1ª Edición. Elsevier ISBN: 978-84-9113-355-1.
  - **Seisdedos Benzal A**, Galán Rodríguez A. (2019) “Capítulo 34: Alteración de pares craneales” en Medicina Interna en Pequeños Animales. 1ª Edición. Elsevier ISBN: 978-84-9113-355-1.
  - Galán Rodríguez A, **Seisdedos Benzal A**. (2019) “Capítulo 53: Tetraparesia flácida” en Medicina Interna en Pequeños Animales. 1ª Edición. Elsevier ISBN: 978-84-9113-355-1.
  - Galán Rodríguez A, **Seisdedos Benzal A**. “Capítulo 17: Sistema nervioso” en Manual Clínico del perro y el gato 3ª edición. Elsevier (En prensa).

Además de trabajar en el desarrollo de su Tesis Doctoral y las publicaciones y comunicaciones que se le derivan, el doctorando ha desarrollado otros trabajos y estudios de investigación desarrollados en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal y en el HCV.

Por todo lo expuesto anteriormente, las directoras autorizan la defensa de esta Tesis Doctoral.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, \_\_13\_\_ de \_\_\_\_\_Noviembre\_\_\_\_\_ de \_\_2020\_\_\_\_\_

Firma del/de los director/es

Fdo.: \_\_\_\_\_ Fdo.: \_\_\_\_\_

*A MIS PADRES*

*A MI HERMANO*

*A TI, MACARENA*

*Al olmo viejo, hendido por el rayo  
y en su mitad podrido,  
con las lluvias de abril y el sol de mayo,  
algunas hojas nuevas le han salido.*

*¡El olmo centenario en la colina  
que lame el Duero! Un musgo amarillento  
le mancha la corteza blanquecina  
al tronco carcomido y polvoriento.*

*No será, cual los álamos cantores  
que guardan el camino y la ribera,  
habitado de pardos ruiseñores.*

*Ejército de hormigas en hilera  
va trepando por él, y en sus entrañas  
urden sus telas grises las arañas.*

*Antes que te derribe, olmo del Duero,  
con su hacha el leñador, y el carpintero  
te convierta en melena de campana,  
lanza de carro o yugo de carreta;  
antes que rojo en el hogar, mañana,  
ardas de alguna mísera caseta,  
al borde de un camino;  
antes que te descuaje un torbellino  
y tronche el soplo de las sierras blancas;  
antes que el río hasta la mar te empuje  
por valles y barrancas,  
olmo, quiero anotar en mi cartera  
la gracia de tu rama verdecida.*

*Mi corazón espera  
también, hacia la luz y hacia la vida,  
otro milagro de la primavera.*

Antonio Machado (*Campos de Castilla*, 1912)

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

RESUMEN/abstract.....	1
RESUMEN .....	2
ABSTRACT: .....	4
CAPÍTULO 1—INTRODUCCIÓN.....	6
CAPÍTULO 2—OBJETIVOS.....	9
CAPÍTULO 3—REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Anatomía y fisiología del metabolismo energético cerebral.....	12
3.2 LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.....	17
3.2.1 Anatomía del sistema ventricular y fisiología del líquido cefalorraquídeo .....	17
3.2.2. Análisis del líquido cefalorraquídeo en la clínica veterinaria .....	23
3.2.3 Marcadores de enfermedad y biomarcadores medidos en líquido cefalorraquídeo .....	29
3.2.4 Marcadores del metabolismo energético cerebral en el líquido cefalorraquídeo.....	35
3.3 ANESTESIA .....	69
3.3.1 Propofol.....	70
3.3.2 Isoflurano .....	74
3.3.3 Influencia de los anestésicos en el metabolismo energético cerebral .....	76
3.4 NUTRACÉUTICOS .....	82
CAPÍTULO 4 —MATERIAL Y MÉTODO.....	89
Sujetos de estudio .....	91
Anestesia.....	91
Obtención de líquido cefalorraquídeo y análisis .....	93
Análisis estadístico.....	95
CAPÍTULO 5 — RESULTADOS.....	96
ESTUDIO 1.....	97
ESTUDIO 2.....	99
ESTUDIO 3.....	101
ESTUDIO 4.....	104
CAPÍTULO 6 — discusión.....	105
ESTUDIO 1 .....	106
ESTUDIO 2 .....	115
ESTUDIO 3 .....	121
ESTUDIO 4 .....	129
CONCLUSIONES.....	131
BIBLIOGRAFÍA .....	133
ABREVIATURAS .....	155
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS DOCTORAL .....	161
AGRADECIMIENTOS.....	164



## RESUMEN/ABSTRACT

---

## RESUMEN

---

La tendencia actual en medicina humana y medicina veterinaria es la de encontrar biomarcadores que puedan ser utilizados en la detección temprana de enfermedades. Los biomarcadores son variantes funcionales o índices cuantitativos de un proceso biológico, el cual estima la predisposición de un determinado paciente a sufrir una enfermedad, prediciendo su evolución y su respuesta al tratamiento. En medicina veterinaria disponemos de pocos estudios que establezcan rangos de referencia para diferentes biomarcadores del metabolismo energético cerebral. Además, los estudios publicados presentan una alta heterogeneidad en cuanto a protocolos anestésicos utilizados, momento y lugar de extracción de las muestras de líquido cefalorraquídeo, tratamientos previos administrados al animal, edades y razas incluidas.

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se escogieron perros de raza Beagle sanos, a los que se sometió a una primera anestesia general para extraer líquido cefalorraquídeo con el objetivo de medir niveles de lactato (1,189 mM/L), piruvato (0,0577 mM/L) y ratio lactato/piruvato (44,247) en muestras extraídas en cisterna cerebelomedular. Tras obtener los niveles basales de estos biomarcadores, evaluamos el efecto de la suplementación de la dieta con nutracéuticos. Para ello, los animales fueron anestesiados en dos ocasiones, con una separación de 50 días, tiempo durante el cual estuvieron tomando el suplemento nutricional. Obtenemos muestras de líquido cefalorraquídeo antes y después del tratamiento para medir proteínas totales (21 g/dL), recuento de células nucleadas (< 5 células/ $\mu$ L), glucosa (59 mg/dL), sodio (151 mM/L), cloro (132 mM/L), potasio (2,96 mM/L), lactato (1,53 mM/L), piruvato (0,028 mM/L) y su ratio (16,2). Tras el tratamiento observamos que los niveles de sodio (160 mM/L) y glucosa (73 mg/dL) aumentaron significativamente a la vez que disminuyeron los valores de lactato (1,21 mM/L) y el ratio lactato/piruvato (9,9), poniendo de manifiesto la mejoría en el estado oxidativo del encéfalo.

Para valorar el efecto de los agentes anestésicos y el tiempo de duración de la anestesia en los biomarcadores del metabolismo energético cerebral, sometimos a todos los animales a dos anestias, una exclusivamente con isoflurano y otra con propofol. Medimos valores de lactato, piruvato, glutamato, glucosa, creatin kinasa, proteínas totales y electrolitos en dos tiempos diferentes, una vez a los 15 minutos de la inducción

anestésica (T0) y por segunda vez a las 3 horas de la inducción (T3). Observamos que los valores de lactato en el grupo anestesiado con propofol fueron significativamente más bajos en T3 (1,02 mM/L) que en T0 (1,4 mM/L). Sin embargo, en el grupo de perros anestesiados exclusivamente con isoflurano, los valores de lactato en T3 (1,58 mM/L) mostraron una tendencia a aumentar con el tiempo anestésico (T0 = 1,43 mM/L).

Finalmente, para valorar el efecto del lugar de extracción del líquido cefalorraquídeo, llevamos a cabo la medición de lactato en cisterna cerebelomedular y cisterna lumbar. Para la extracción de líquido cefalorraquídeo empleamos el mismo procedimiento anestésico descrito en el párrafo anterior. Observamos resultados significativamente mayores de lactato en cisterna lumbar (1,58 mM/L) en comparación con los obtenidos en cisterna magna (1,44 mM/L). De esta forma se corrobora el flujo rostrocaudal del líquido cefalorraquídeo en el sistema nervioso central del perro, al igual que en humanos y en el caballo.

Los datos obtenidos en nuestro estudio ponen de manifiesto la importancia de la medición de los valores de determinados biomarcadores bajo condiciones controladas de anestesia, tiempos de duración previos a la extracción de la muestra y lugar de extracción. Los estudios publicados hasta la fecha no establecen rangos de referencia bajo condiciones similares a las de nuestro estudio. La falta de determinación de rangos fisiológicos puede conllevar al veterinario clínico a errores en la interpretación de los resultados, dando lugar a errores diagnósticos. Por ello, conocer la influencia de los agentes anestésicos, el tiempo y lugar de extracción y el posible tratamiento previo de los animales resulta fundamental para la correcta interpretación analítica de los biomarcadores del metabolismo energético cerebral.

## ABSTRACT:

---

The current trend in both human and veterinary medicine is to find biomarkers that can be used in the early detection of diseases. Biomarkers are functional variants or quantitative indices of a biological process, which estimates the predisposition of a certain patient to suffer from a disease, predicting its evolution and response to treatment. In veterinary medicine, we have few studies that establish reference ranges for different biomarkers of brain energetic metabolism. In addition, the studies published so far show a marked heterogeneity in terms of the anesthetic protocols used, time and place of extraction of the cerebrospinal fluid samples, previous treatments administered to the animal, ages and breeds included.

For the development of this doctoral dissertation, healthy Beagle breed dogs were chosen, which underwent a first general anesthesia to extract cerebrospinal fluid in order to measure lactate levels (1,189 mM/L), pyruvate levels (0,0577 mM/L), and lactate/pyruvate ratio (44,247) in samples extracted from cerebellomedullary cistern. After obtaining the basal levels of these biomarkers, we evaluated the effect of supplementing the diet with nutraceuticals. For this, the animals were anesthetized twice, 50 days apart, during which they were taking the nutritional supplement. We obtained samples of cerebrospinal fluid before and after treatment to measure total proteins (21 g / dL), nucleated cell count (<5 cells /  $\mu$ L), glucose (59 mg / dL), sodium (151 mM / L), chlorine (132 mM / L), potassium (2.96 mM / L), lactate (1.53 mM / L), pyruvate (0.028 mM / L), and their ratio (16.2). After treatment, a significant increase in the levels of sodium (160 mM/L) and glucose (73 mg/dL) was noticed, whereas a decrease in the lactate value (1,21 mM/L) and lactate/pyruvate ratio (9,9) was observed, showing an improvement in the oxidative state of the brain.

To assess the effect of the anesthetic agents and the duration of anesthesia on the biomarkers of brain energy metabolism, all the animals were anesthetized in two periods, one of them exclusively with isoflurane, and the other, also exclusively with propofol. Values of lactate, pyruvate, glutamate, glucose, creatine kinase, total proteins, and electrolytes were measured at two different times, the first one, 15 minutes after anesthetic induction (T0), and the second one, 3 hours after induction (T3). It was observed that lactate values within the group of dogs anesthetized with propofol were

significantly lower in T3 (1,02 mM/L) than in T0 (1,4 mM/L). However, in the group of dogs anesthetized exclusively with isoflurane, lactate values in T3 (1,58 mM/L) showed a tendency to increase with anesthetic time (T0 = 1,43 mM/L).

Finally, in order to assess the effect of the cerebrospinal fluid extraction site, lactate values were measured in cerebellomedullary cistern as well as lumbar cistern. For the cerebrospinal fluid extraction, the same anesthetic procedure as described in the previous paragraph was used. Significantly higher lactate values were observed in the lumbar cistern (1,58 mM/L) compared to those obtained in cerebellomedullary cistern (1,44 mM/L). In this way, the rostro-caudal flow of cerebrospinal fluid in the central nervous system of dogs is corroborated, as it was in humans and horses.

The data obtained in our study evidence the importance of measuring the values of certain biomarkers under controlled conditions of anesthesia, duration times prior to sample extraction, and extraction site. The studies published to date do not establish reference ranges under conditions which are similar to those of our study. The lack of determination of physiological ranges can lead the clinical veterinarian to make mistakes in the interpretation of the results, giving rise to diagnostic errors. For this reason, knowing the influence of anesthetic agents, the time and place of extraction, as well as the possible previous treatment of the animals is essential for the correct analytical interpretation of biomarkers of brain energetic metabolism.

## CAPÍTULO 1—INTRODUCCIÓN

---

En la actualidad, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, se investiga constantemente con el fin de encontrar nuevas técnicas diagnósticas y nuevos marcadores que sirvan como indicador pronóstico de la evolución de una enfermedad. De esta manera, conociendo en profundidad la fisiopatología de una enfermedad, se podrá conseguir un diagnóstico más precoz y en consiguiente, un tratamiento más efectivo para la misma.

En el caso concreto de las enfermedades que afectan al sistema nervioso central (SNC), la obtención de muestras para el diagnóstico es complicada. El SNC se compone del parénquima nervioso, las meninges y el líquido cefalorraquídeo (LCR). Este último es un líquido resultante del filtrado del plasma y de la secreción membranosa, por lo que su composición difiere de la del plasma. En condiciones fisiológicas se trata de un fluido transparente con muy poca celularidad y baja concentración de proteínas. El LCR mantiene un contacto estrecho con el parénquima nervioso, por lo que las alteraciones que se producen en el tejido neuronal pueden verse reflejadas en la composición del LCR. Su obtención se lleva a cabo mediante punción en cisterna cerebelomedular o en espacio lumbosacro, para lo cual es necesaria la anestesia general del paciente.

Una de las tendencias actuales en medicina humana se centra en buscar biomarcadores en LCR que reflejen cambios en el ratio metabólico cerebral que puedan ser justificados por determinadas patologías. Estudios como el de Parnetti y col. (2000) o el de Liguori y col. (2015) encuentran niveles anormalmente altos de lactato y piruvato en personas con Alzheimer, demencia vascular, meningitis infecciosa y linfoma. Alteraciones similares han sido descritas por Pugliese y col. (2005) en perros con un grado severo de disfunción cognitiva.

En medicina veterinaria existen relativamente pocos estudios que relacionen las alteraciones en las concentraciones de neurotransmisores, enzimas y sustratos metabólicos neuronales con diferentes patologías. Además, los estudios que establecen rangos fisiológicos de referencia en el perro son aún más escasos y variables. En base a ello, resulta necesario llevar a cabo estudios basales en pacientes sanos. Dichos estudios deberían tener en cuenta parámetros como la raza, edad, sexo, lugar de punción y protocolo anestésico utilizado para la toma de muestras, ya que los agentes anestésicos pueden interferir en el ratio metabólico celular.

El pilar esencial del estudio de la fisiología del metabolismo energético cerebral (MEC) se fundamenta en el hecho de que la actividad neuronal está íntimamente ligada al flujo sanguíneo cerebral y al metabolismo energético. La reducción en el aporte de sangre y nutrientes al parénquima encefálico se traduce en una alteración del metabolismo glucídico oxidativo, obligando a las neuronas a emplear rutas metabólicas alternativas que van a producir metabolitos detectables en el LCR. Como ocurre en el síndrome de disfunción cognitiva canina (SDCC), la alteración del metabolismo oxidativo provoca una cascada metabólica que conlleva una menor producción de ATP. Esto comporta una reducción de la actividad de la bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ , provocando el aumento del  $\text{K}^+$  extracelular, el bloqueo de la despolarización neuronal y el deterioro de la función cognitiva. Hasta la fecha se conoce que tanto personas con demencia como perros con SDCC se benefician de la ingesta de dietas enriquecidas con antioxidantes, vitaminas, ácidos grasos omega 3 y triglicéridos de cadena media. Sin embargo, en el perro, no se ha determinado el impacto real de este tratamiento nutricional en el metabolismo cerebral.

Con el presente estudio se pretende profundizar en el conocimiento de la composición del LCR en perros sanos atendiendo a los siguientes factores: (i) la obtención de datos que contribuyan a establecer unos valores de referencia de determinados biomarcadores del MEC, (ii) la observación de las fluctuaciones de dichos marcadores en pacientes sometidos a suplemento dietético con nutracéuticos, (iii) la detección de posibles variaciones de estos parámetros en función del protocolo anestésico utilizado, o (iv) en función del lugar de extracción de LCR.

## CAPÍTULO 2—OBJETIVOS

---

Debido al elevado número de enfermedades que afectan al SNC del perro y a la escasez de estudios sobre biomarcadores del MEC, resulta complicado extrapolar datos de un estudio a otro. Los trabajos publicados hasta la fecha emplean diversas razas (Pugliese y col. 2005, Creevy y col. 2013), diversos protocolos anestésicos (Caines y col. 2012, Witsberger y col. 2012), y pacientes afectados por diferentes enfermedades y sometidos a varios tratamientos (Yin y col. 2001, Pham y col. 2008). La elevada heterogeneidad de los estudios publicados hasta el momento nos conduce a intentar establecer ciertas bases en el estudio de los biomarcadores del MEC en el perro, por lo que los objetivos de este estudio fueron:

1. Estudiar las concentraciones fisiológicas de lactato, piruvato y ratio L/P en Beagles sanos bajo condiciones específicas de anestesia.
2. Valorar si la administración de compuestos nutracéuticos provoca cambios en determinados biomarcadores (proteínas totales, recuento celular, cloro, sodio, potasio, calcio, glucosa, lactato, piruvato y ratio L/P) en LCR en Beagles sanos.
3. Evaluar la influencia del propofol, isoflurano y duración de la anestesia en diversos marcadores del MEC (lactato, piruvato, glutamato, creatin kinasa, glucosa y electrolitos) en el LCR en perros sanos de raza Beagle.
4. Estudiar las diferencias en la concentración de lactato en LCR obtenido mediante punción en cisterna magna y en cisterna lumbar en Beagles sanos.

## CAPÍTULO 3—REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

### 3.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL

---

El encéfalo es el órgano con los mayores requerimientos nutricionales, consumiendo hasta el 20% del oxígeno y el 25% de la glucosa ingerida. Posee pequeñas reservas y depende del constante aporte de sangre y nutrientes por el sistema circulatorio (Bélanger y col. 2011).

El SNC está formado por dos tipos de células: las neuronas, que actúan como la unidad funcional, y las células de glía, cuya función es dar soporte y nutrición a las neuronas. La neurona se forma durante el desarrollo embrionario a partir del neuroectodermo. Son células muy especializadas, asimétricas y polarizadas. La neurona presenta un soma o cuerpo neuronal donde se encuentra la mayor parte de los orgánulos y dos tipos de procesos citoplasmáticos: las dendritas y los axones, a través de los cuales mantienen una estrecha relación con las demás neuronas. La neuroglía la componen los astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales. Los astrocitos son las células más implicadas en el metabolismo del SNC. Derivan del neuroectodermo al igual que las neuronas, producen proteínas, moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento y se conectan por un lado a los capilares y por otro a las neuronas que nutren mediante procesos perisinápticos. Son células que se unen mediante uniones tipo GAP llegando a formar un entramado celular altamente organizado (Jaggy 2010).

Los astrocitos son células de glía muy especializadas cuyas funciones son las siguientes: (i) el control de la homeostasis, (ii) nutrición y almacenamiento de energía en forma de glucógeno, (iii) formación y remodelación de las sinapsis, (iv) modulación de la actividad sináptica mediante gliotransmisores y la recaptación de neurotransmisores, y (v) la defensa contra el estrés oxidativo y la reparación de tejidos (Bélanger y col. 2011). Gordon y col. (2008) observaron que la actividad neuronal en condiciones de hipoxemia provocaba una tendencia a vasodilatación arteriolar mientras que en condiciones con altos niveles de oxígeno se producía vasoconstricción. Este fenómeno es conocido como hiperemia funcional y depende de forma activa de los astrocitos, los cuales detectan la actividad neuronal y regulan el flujo sanguíneo cerebral.

El sustrato energético principal de la neurona es la glucosa. No obstante, las células nerviosas son capaces de utilizar de forma eficiente otros sustratos energéticos como el piruvato, lactato o glutamato, los cuales se sintetizan a partir de la glucosa en la propia célula. Los principales mecanismos por los que la neurona consume energía son las sinapsis, los potenciales de acción y la constante liberación y recaptación de neurotransmisores. En concreto, el mantenimiento de la excitabilidad neuronal a través de los potenciales sinápticos glutaminérgicos representa el mayor coste energético cortical (Bélanger y col. 2011). Todo esto pone de manifiesto la estrecha relación existente entre la actividad neuronal, los requerimientos energéticos en función del grado de actividad celular y la utilización de glucosa o productos derivados de su metabolismo.

Una vez que la glucosa entra en la célula a través de los transportadores específicos de glucosa, ésta es fosforilada por hexokinasas a glucosa-6-fosfato (G6F). La G6F puede seguir tres rutas metabólicas distintas:

1. **Glucolisis:** La glucolisis es un proceso anaerobio que permite obtener energía a partir de la glucosa en células que carecen de mitocondria o en situaciones de hipoxia tisular. Durante la glucolisis se producen una serie de reacciones bioquímicas que darán lugar a dos moléculas de piruvato, 2 ATP y NADH. Cuando hay suficiente oxígeno, el piruvato entra en la mitocondria para seguir un metabolismo oxidativo a través del ciclo de Krebs, produciendo entre 30-34 moléculas de ATP, CO<sub>2</sub> y agua. El piruvato es utilizado por la célula como fuente de energía mucho más eficiente que la glucosa durante el metabolismo oxidativo. En condiciones de anaerobiosis, el piruvato puede ser reducido a lactato mediante la lactato-deshidrogenasa (LDH) y difundir al espacio extracelular. Ésta es una reacción reversible: cuando vuelve a haber oxígeno disponible, el lactato es reconvertido a piruvato y puede volver a ser usado para generar energía o para convertirse en glucosa (Mattson-Porth y Matfin 2008, Bélanger y col. 2011).
2. **Vía de la pentosa-fosfato (VPP):** La VPP es utilizada por la célula para la síntesis de ribonucleótidos y de NADPH. El NADPH es una coenzima que se utiliza en la síntesis de ácidos grasos y en la inactivación de radicales libres (RL), participando de forma activa en el potencial de oxidoreducción celular. La

VPP consta de dos fases, una oxidativa y otra no oxidativa (Mattson-Porth y Matfin 2008). En la fase oxidativa la célula usa la G6F para generar 2 NADPH. La célula emplea la vía no oxidativa en función de la demanda energética del momento. Si la célula precisa mantener un potencial de oxidoreducción, se activará la vía oxidativa para producir NADPH. Por el contrario, si la célula precisa sintetizar ribonucleótidos, se potenciará la fase no oxidativa con la consiguiente producción de intermediarios de la glucólisis (Patra y Hay 2014). De este modo la célula presenta interconexiones entre todas sus rutas metabólicas con el fin de obtener energía de la manera más eficiente posible.

3. Glucógeno: El glucógeno es un polisacárido que se encuentra en abundancia en diferentes órganos como el músculo y el hígado, constituye la principal reserva de glucosa del organismo y puede ser reconvertido a glucosa en situaciones de hipoglucemia. A nivel del SNC las reservas de glucógeno son muy reducidas y se encuentran principalmente en los astrocitos (Cataldo y Broadwell 1986). Los astrocitos captan la glucosa mediante sus ramificaciones perivasculares y, una vez es degradada a G6F, sigue su fosforilación a glucosa-1-fosfato y uridín difosfato glucosa (UDFG). La UDFG glucosa es finalmente transformada mediante la forma activa de la glucógeno-sintetasa en glucógeno. Esto es un proceso reversible por el que el glucógeno puede ser fosforilado hasta producir lactato, que será expulsado al espacio extracelular para el aprovechamiento por parte de la neurona (Falkowska y col. 2015). Según estudios como el de Sagar y col. (1987), la distribución del glucógeno en el encéfalo no es homogénea, siendo más abundante en la sustancia gris que en la blanca y en las zonas con mayor densidad de sinapsis, como el tálamo, hipotálamo, corteza, puente y cerebelo, entre otros. Esto explica la gran importancia de las reservas de glucógeno en los astrocitos con el fin de abastecer de energía a las neuronas en los momentos de mayor consumo.

Tanto las neuronas como los astrocitos son capaces de oxidar la glucosa completamente para producir energía, pero en condiciones fisiológicas usan rutas metabólicas diferentes y complementarias. Mientras las neuronas tienen un ratio metabólico oxidativo mayor que las células de glía, los astrocitos son eminentemente glucolíticos. La neurona posee baja concentración de la enzima 6-fosfofructosa-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3 (Pfkfb3) en relación a los astrocitos. Esta enzima es un

potente activador de la glucólisis y su sobreactivación conlleva estrés oxidativo y la apoptosis, razón por la cual la neurona no es capaz de mantener un alto metabolismo glucolítico (Herrero Méndez y col. 2009). Para asegurar el elevado gasto energético que supone la actividad neuronal, la neurona emplea principalmente el lactato para llevar a cabo un metabolismo oxidativo mitocondrial y producir ATP. De esta manera se evita el estrés oxidativo derivado de la glucólisis y se ahorra glucosa para emplearla en la VPP y producir NADPH con alto poder antioxidante (Bélanger y col. 2011). Diversos estudios *in vitro* han demostrado que en igualdad de condiciones, la neurona utiliza preferentemente el lactato para generar energía en lugar de la glucosa (Schurr y col. 1999). Smith y col. (2003) elaboran un estudio *in vivo* sobre el uso de glucosa y lactato como fuentes de energía en el encéfalo humano. Para ello utilizan la tomografía por emisión de positrones (PET) y fluorodesoxiglucosa. Los autores concluyen que en un paciente euglicémico al que se le aporta por vía intravenosa una solución rica en lactato, se disminuye un 17% el uso de glucosa en el encéfalo durante el tiempo durante el cual se le administra la infusión continua de lactato. Desde un punto de vista celular, la transformación de la glucosa en piruvato para generar energía mediante el ciclo de Krebs es más costosa energéticamente que transformar el lactato disponible en piruvato, ya que esta reacción no depende del ATP (Magistretti y Pellerin 1997, Smith y col. 2003).

Por otro lado, los astrocitos presentan una elevada actividad glucolítica derivada de la alta concentración de Pfkfb3, dando lugar a grandes cantidades de lactato que será excretado al espacio extracelular para su uso por parte de las neuronas. En el estudio de Porras y col. (2004) observaron la tendencia en la utilización de glucosa en un cultivo celular mixto y certificaron la preferencia de las neuronas por el lactato antes que por la glucosa. Tras la actividad glutaminérgica derivada de la excitación neuronal, los astrocitos retiran del espacio sináptico el glutamato. Éste es convertido a glutamina pudiendo pasar al ciclo de Krebs para producir energía o ser reconvertida en glutamato y devuelto a la neurona para mantener sus reservas intactas. En este momento se inhibe la captación de glucosa por parte de la neurona y se inhibe por tanto la glucólisis, obligando a la neurona a utilizar el lactato extracelular para producir energía mediante metabolismo oxidativo. De forma simultánea, los astrocitos activan la ruta glucolítica y se produce un flujo de glucosa hacia el interior del astrocito para producir el lactato que usarán las neuronas (Porras y col. 2004).

El estrés oxidativo generado como consecuencia del metabolismo aerobio de la glucosa se debe a la liberación de RL durante el proceso de oxidación glucídica, al elevado índice de ácidos grasos insaturados presentes en el SNC (predispuestos a peroxidación lipídica) y a la baja capacidad antioxidante del encéfalo. La molécula con mayor potencial antioxidante presente en el SNC es el glutatión y se encuentra principalmente en astrocitos, por lo que éstos se encargan de la protección de las neuronas circundantes (Bélanger y Magistretti 2009).

El elevado ratio de metabolismo oxidativo neuronal, unido a su escasa capacidad de defensa contra el daño oxidativo, su incapacidad para mantener de forma autónoma sus necesidades energéticas y su escasa capacidad glucogenogénica, justifica el hecho de que el MEC sea un proceso compartimentalizado que depende de la acción conjunta de neuronas y astrocitos.

## 3.2 LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

### 3.2.1 Anatomía del sistema ventricular y fisiología del líquido cefalorraquídeo

El LCR es un líquido transparente, resultante del ultrafiltrado del plasma y producido por los plexos coroideos. Contiene poca celularidad y una baja concentración de proteínas. Se encuentra tanto en el sistema ventricular a nivel del encéfalo como en el canal endimeario en la médula espinal y en el espacio subaracnoideo envolviendo todo el SNC (De la Hunta y Glass 2009, Braun y col. 2017).

El sistema ventricular lo componen cuatro ventrículos (Figura 1). Los ventrículos laterales se encuentran a nivel del telencéfalo, cada uno en un hemisferio cerebral. Se pueden dividir en 5 regiones: los cuernos occipital y frontal, cuerno temporal, el cuerpo, el atrio y un receso hacia el bulbo olfatorio. Ambos ventrículos laterales comunican con el tercer ventrículo a través de los orificios interventriculares o de Monro (Di Terlizzi y Platt 2006). El tercer ventrículo se encuentra en diencéfalo, en las inmediaciones de la adherencia intertalámica y comunica con el cuarto ventrículo, ya en tronco del encéfalo, mediante el acueducto mesencefálico o de Sylvius. (Bernardini

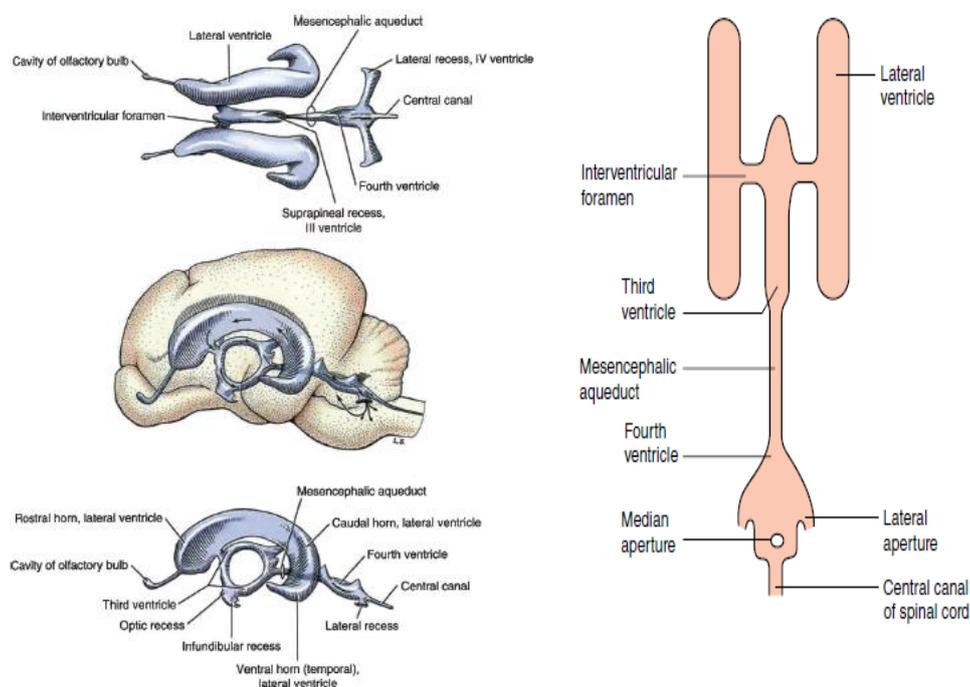


FIGURA 1: Representación del sistema ventricular en el encéfalo en su vista dorsoventral y laterolateral a la izquierda y representación esquemática a la derecha. Imágenes de Kent y col. (2016) (izquierda) y Skerritt (2018) (derecha).

2010). El LCR pasa del cuarto ventrículo (cavidad triangular en mielencéfalo) al espacio subaracnoideo por medio del orificio de Magendi (situado en el techo del cuarto ventrículo en la línea media) y los orificios laterales de Luschka en la fosa rostrocaudal. De aquí pasa al espacio subaracnoideo, localizado entre la duramadre y la piamadre (Di Terlizzi y Platt 2006, Jaggy 2010).

Las meninges son las tres membranas que envuelven todo el SNC (Figura 2) y se desarrollan a partir de la cresta neural durante el desarrollo embrionario. La duramadre es la más externa de todas. A nivel del encéfalo se encuentra adherida al periostio y no

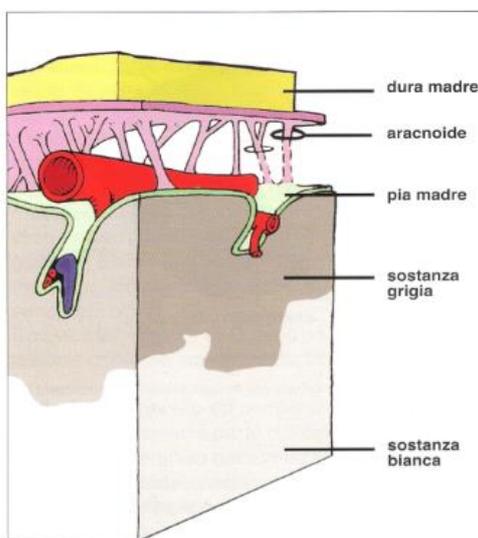


FIGURA 2: Representación gráfica de las meninges a nivel encefálico. Bernardini (2010).

existe espacio epidural, mientras que a nivel medular se encuentra separada del periostio vertebral por este espacio. Es la capa más gruesa y está compuesta principalmente por tejido conectivo. En la transición entre la duramadre y la aracnoides (membrana intermedia), se encuentra una capa monocelular de células escamosas epiteliales. La aracnoides es una delgada capa de tejido conectivo por la que circula el LCR. La presión que ejerce el LCR permite que la aracnoides se mantenga unida a la duramadre mediante desmosomas. La aracnoides contiene

además vasos sanguíneos, raíces nerviosas y trabéculas de colágeno que le permiten unirse a la membrana más profunda, la piamadre. Ésta es una delgada capa de tejido conectivo que se une en su superficie externa con la aracnoides y en su cara interna se fusiona con el parénquima encefálico y la médula espinal. A nivel medular, en el tránsito entre raíces nerviosas contiguas, la piamadre y la aracnoides están firmemente unidas a la duramadre formando el ligamento denticulado que mantiene la médula espinal suspendida dentro de la

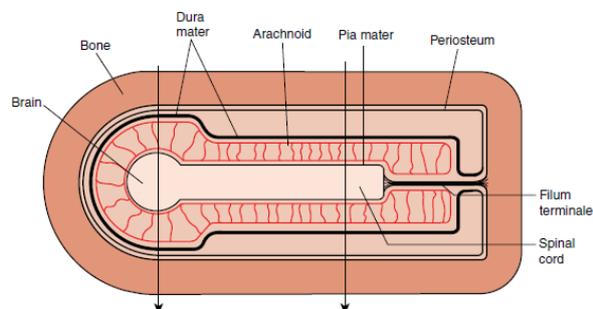


FIGURA 3: Diagrama del neuroeje y sus meninges. a la izquierda de la imagen se observa como la duramadre se une al periostio. a la derecha queda representado el espacio epidural a nivel medular. Skerritt (2018).

duramadre (De la Hunta y Glass 2009, Skerritt 2018). Las raíces nerviosas (dorsal y ventral) de la médula espinal están rodeadas por unas prolongaciones formadas por la duramadre y la aracnoides, envolviendo el tejido nervioso con LCR hasta su salida por el agujero intervertebral. A nivel intracraneal ocurre lo mismo con las raíces de los pares craneales hasta la salida del nervio de la cavidad craneal por su correspondiente orificio. En el caso de los nervios olfatorio y óptico, las meninges cubren todo el nervio hasta su llegada a la cavidad nasal y al globo ocular, respectivamente. Las infecciones en estas localizaciones pueden tener una rápida distribución a SNC provocando meningitis/meningoencefalitis (Skerritt 2018).

La presencia de las tres membranas meníngeas determina la existencia de 3 espacios asociados. El espacio epidural contiene tejido conectivo y grasa, sólo está presente en la médula espinal y está delimitado por el periostio y la duramadre. A nivel intracraneal desaparece como consecuencia de la unión de la duramadre al periostio de la cara interna de los huesos que conforman la cavidad craneal (Figura 3). El espacio subdural es un espacio virtual entre la duramadre y la aracnoides. El espacio subaracnoideo se encuentra entre la aracnoides y la piamadre y contiene el LCR, arterías, venas y raíces nerviosas (De la Hunta y Glass 2009).

El LCR es producido principalmente a partir de los plexos coroideos localizados en los cuatro ventrículos, siendo el plexo coroideo del cuarto ventrículo el de mayor volumen (Figura 4). Se trata de una membrana semipermeable que permite el libre

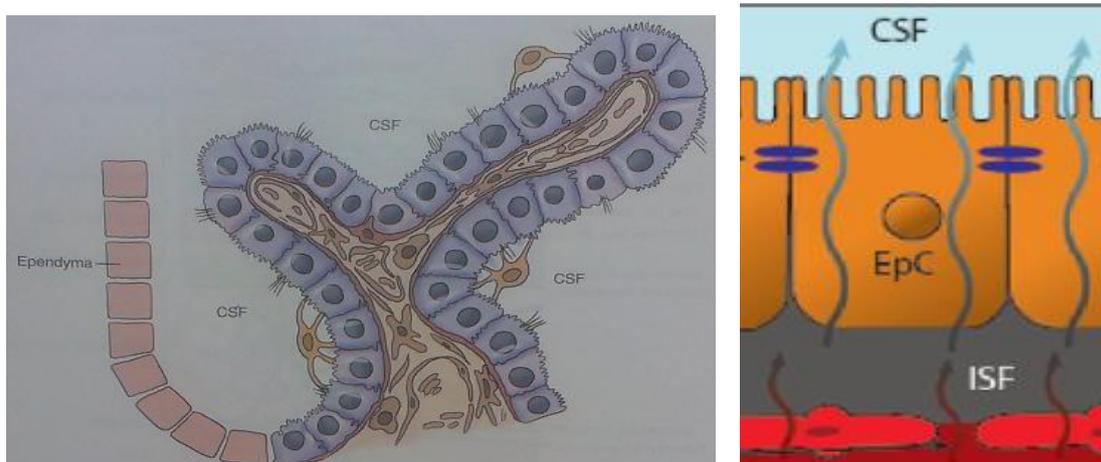


FIGURA 4: Izquierda: representación gráfica de las vellosidades aracnoideas hacia el interior del ventrículo. De la Hunta y Glass (2009). Derecha: detalle de la formación y flujo del lcr desde el espacio intravascular, pasando por la membrana basal (ISF), células epiteliales cuboidales del plexo con uniones oclusivas entre ellas y microvellosidades hacia la cavidad ventricular (Simon y Lliff 2016).

tránsito de algunas moléculas y el transporte activo de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ), calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ). El plexo coroideo lo constituyen numerosas invaginaciones y vellosidades que se proyectan hacia el interior de la cavidad ventricular (Tipold 2003, Simon y Lliff 2016). Las células epiteliales del plexo son células cuboidales que garantizan la impermeabilidad de la membrana mediante uniones de oclusión entre ellas, evitando el libre tránsito de moléculas al LCR (De la Hunta y Glass 2009).

El LCR resultante del ultrafiltrado del plasma en los plexos coroideos se libera directamente a la cavidad ventricular, donde existe un flujo bidireccional predominantemente rostro-caudal. La albúmina sérica ionizada inyectada en cisterna lumbar (CL) en personas tarda de 12 a 24 horas en alcanzar el encéfalo, mientras que la inoculada en cisterna magna (CM) llega a nivel toracolumbar en tan solo 40 minutos (Chiro y col. 1976). El flujo a nivel intraventricular depende principalmente de la actividad pulsátil de la sangre en los plexos coroideos, mientras que el tránsito del LCR del espacio subaracnoideo intracraneal al medular depende de la

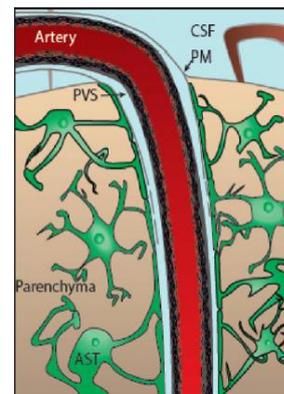


FIGURA 5: Arteria encefálica introduciéndose desde el espacio subaracnoideo hacia el parénquima encefálico y espacio perivascular asociado (PVS). Simon y Lliff (2016).

contractilidad del corazón y del pulso arterial intracraneal (Simon y Lliff 2016). El LCR pasa finalmente del espacio subaracnoideo al parénquima encefálico junto a los grandes vasos aracnoideos que se introducen en el parénquima. Este espacio perivascular (Figura 5) es un espacio virtual formado por una extensión de la aracnoides hacia la piamadre, que se puede reducir prácticamente al espacio que queda entre la separación de células contiguas (De la Hunta y Glass 2009).

Finalmente el LCR es reabsorbido en su mayor parte en las vellosidades aracnoideas de los plexos venosos (Figura 6). Es una reabsorción unidireccional facilitada por la monocapa celular del seno venoso que permite el transporte pasivo del LCR hacia el lumen vascular cuando la presión del LCR excede a la presión venosa. Además de los senos venosos, el LCR se puede reabsorber en menor medida a través de: (i) los vasos encefálicos intraparenquimatosos, (ii) los vasos sanguíneos y linfáticos en la salida de las raíces nerviosas medulares y nervios craneales olfatorio, óptico y vestibulococlear, y (iii) a través de la lámina cribosa a la cavidad nasal (De la Hunta y

Glass 2009, Jaggy 2010, Skerritt 2018, Norwood y col. 2019). El LCR circula por el espacio subaracnoideo desde la fosa rostrocaudal donde se encuentra el cuarto

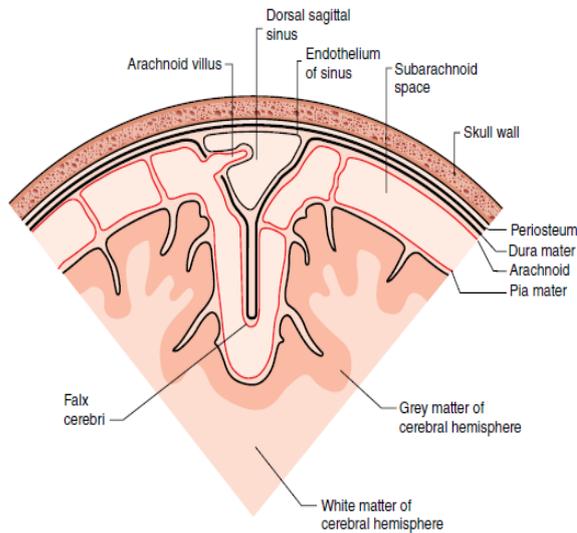


FIGURA 6. Diagrama del seno venoso dorsal. las vellosidades aracnoideas se proyectan hacia el interior del seno. el LCR difunde hacia el espacio intravenoso atravesando las células del endotelio aracnoideo y venoso cuando la presión del lcr es superior a la presión venosa. Skerritt (2018).

ventrículo hasta el bulbo olfatorio, junto a la lámina cribosa del etmoides, a través de la cual pasa a cavidad nasal para ser reabsorbido por los vasos linfáticos (Sokolowski y col. 2018). Las alteraciones en la circulación del LCR pueden contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y vasculares como el Alzheimer en personas, procesos isquémicos cerebrales o hidrocefalia entre otras (Simon y Liff 2016, Norwood y col. 2019).

Las funciones del LCR son de protección y nutrición. Por un lado el LCR que envuelve todo el SNC actúa de amortiguación para los golpes y movimientos bruscos a modo de mecanismo de suspensión. Sin embargo, ante movimientos bruscos de aceleración o desaceleración, este mecanismo de protección puede verse superado. Al golpear el encéfalo contra las paredes óseas se produce contusión o concusión parenquimatosa, lo que conlleva una lesión por cizallamiento con la aparición de hemorragias y edema vasogénico. El LCR actúa en la modulación de la presión intracraneal (PIC). La PIC puede aumentar por cambios en la presión arterial y en la presión venosa central ante determinados esfuerzos corporales, cambios de postura y durante la respiración (i.e. en la inspiración disminuye la presión del LCR y en la expiración aumenta) (Di Terlizzi y Platt 2006). Cuando aumenta la PIC, el encéfalo se adapta al cambio de presión mediante variaciones en el volumen de LCR, siguiendo la teoría de Monro-Kellie. El parénquima es un compartimento estable con poca adaptación al cambio. Sin embargo, el LCR y la sangre pueden sufrir relativas variaciones a nivel intracraneal para mantener la PIC. Así, ante aumentos bruscos de presión, el encéfalo responde en primer lugar disminuyendo la producción de LCR o

aumentando su drenaje y salida del cráneo, protegiéndolo así de posibles daños (De la Hunta y Glass 2009).

El LCR presenta además funciones reguladoras controlando el pH encefálico, manteniendo el gradiente químico, posibilitando la distribución de factores neurotróficos, neurotransmisores y hormonas neuroendocrinas, y retirando productos de desecho del metabolismo celular que no atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE), (Di Terlizzi y Platt 2006, De la Hunta y Glass 2009, Simon y Lliff 2016). La BHE es una barrera localizada a nivel de las células endoteliales de los capilares encefálicos, entre el plasma y el fluido extracelular del espacio intersticial. Está formada por una capa de células endoteliales fuertemente unidas entre sí y no fenestradas, una gruesa membrana basal y procesos citoplasmáticos de los astrocitos vecinos. La BHE permite el paso de sustancias como la glucosa, glutamato y algunos aminoácidos, pero es impermeable a otras sustancias, como algunos antibióticos e ivermectinas. Además de la BHE que protege al encéfalo de sustancias exógenas, encontramos la barrera sangre–LCR, que determina la composición de éste último. Esta barrera se encuentra a nivel de los plexos coroideos, está formada por el endotelio vascular del plexo, su membrana basal y el epitelio coroideo (De la Hunta y Glass 2009, Braun y col. 2017).

### 3.2.2. Análisis del líquido cefalorraquídeo en la clínica veterinaria

El LCR envuelve todo el SNC y se encuentra en contacto directo con el parénquima nervioso tanto a nivel encefálico como a nivel medular. La íntima relación que mantienen el LCR y el tejido nervioso es la razón por la que el análisis de la composición del LCR aporta considerable información sobre los cambios que se producen en el SNC en diferentes patologías (Di Terlizzi y Platt 2006, Keen 2014).

La extracción de LCR se realiza bajo anestesia general y debe llevarse a cabo siempre caudal a la lesión debido al flujo eminentemente rostrocaudal del LCR en el SNC. El procedimiento estará contraindicado en todas aquellas enfermedades que aumenten considerablemente el riesgo anestésico o cuando haya indicios de aumento de la PIC, situación en la que la extracción y el cambio repentino de presión pueden provocar una herniación iatrogénica de las estructuras encefálicas alojadas en la fosa posterior (De la Hunta y Glass 2009). La punción se realiza en dos puntos, CM y CL (preferentemente en el espacio intervertebral lumbar L5-L6, aunque también se puede realizar en L4-L5). El procedimiento se lleva a cabo con una aguja espinal de 20-22G y preparando de forma aséptica la zona de punción. En primer lugar se rasura toda la zona, se limpia para retirar los pelos y la suciedad y se realiza un lavado de la piel con antiséptico. Posteriormente se colocan los paños quirúrgicos y se emplean guantes estériles y un recipiente colector estéril (Platt y Olby 2004, Villiers y Blackwood 2009).

La punción en CM se realiza con el paciente en decúbito lateral, la cabeza flexionada realizando un ángulo de 90° con el cuello y paralela a la mesa. El lugar de punción se establece realizando un triángulo equilátero entre los puntos más prominentes de las alas del atlas y la protuberancia occipital externa, llevando a cabo la punción en el punto central de este triángulo. La aguja incide en la piel en posición perpendicular al cuello, se retira el fiador y se avanza lentamente en dirección al ángulo de la mandíbula (Figura 7). Cuando atraviesa la duramadre se nota la falta de resistencia y empieza a fluir el LCR por la



FIGURA 7: Procedimiento de extracción de LCR de CM.

aguja. El LCR debe salir sólo, nunca colocaremos una jeringa para aspirar (De la Hunta y Glass 2009). El volumen máximo de LCR que se debe obtener es de 1ml/5kg (Platt y Olby 2004).

La punción en espacio lumbosacro se lleva a cabo preferentemente en espacio L5-L6, aunque también es posible en L6-L7 y L4-L5. Se coloca al paciente en decúbito lateral y se prepara la zona de punción de la misma manera que para CM, rasurando el pelo desde L3 hasta S3 y a la anchura de las crestas ilíacas (Figura 8). Se arquea la columna desplazando cranealmente las extremidades posteriores y caudalmente las extremidades anteriores, de manera que consigamos la mayor apertura posible al espacio subaracnoideo (Bernardini 2010). El punto de inyección lo determina la línea media dorsal inmediatamente craneal al borde craneal de la apófisis espinosa de L6 y finalmente, se incide en piel en dirección craneal con una angulación de 45° (Platt y Olby 2004, Villiers y Blackwood 2009).

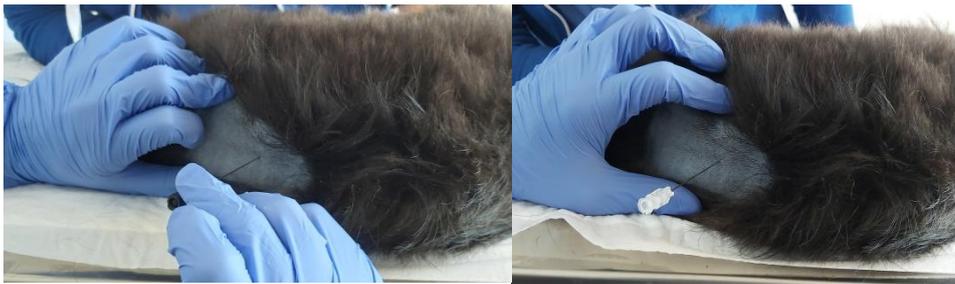


FIGURA 8: Procedimiento de extracción de LCR en CL.

La muestra debe ser procesada en los 30-60 minutos posteriores a la extracción para evitar su deterioro, ya que la baja concentración de proteínas y lípidos y su baja tonicidad provoca la degradación de las membranas celulares. Una hora después de la extracción, en conservación a temperatura ambiente, las células del LCR sufren picnosis del núcleo, lisis de las membranas citoplasmáticas y nucleares (Di Terlizzi y Platt 2006, Villiers y Blackwood 2009). El análisis rutinario del LCR incluye el recuento de proteínas y de células nucleadas (el rango fisiológico de todas las determinaciones rutinarias en LCR se refleja en la Tabla 1). La determinación de proteínas se puede llevar a cabo en un laboratorio especializado mediante espectrofotometría o de forma rutinaria con tira de proteínas o tira de orina. El recuento celular se realiza colocando una muestra de LCR sin centrifugar en un hemocitómetro y se realiza el recuento manual (Villiers y Blacwood 2009). Concentraciones de proteínas superiores a 25mg/dl en CM y 40mg/dl en CL son indicativas de disrupción de la BHE o aumento de la

producción intratecal de inmunoglobulinas, ya sea por procesos inflamatorios, infecciosos, neoplásicos o hemorrágicos (Bernardini 2010). El LCR es un líquido escasamente celular, por lo que recuentos de leucocitos superiores 5 células/ $\mu$ l son indicativas también de disrupción de la BHE (Platt y Olby 2004).

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
Color	Transparente
Proteínas	<25-30mg/dl en CM <40mg/dl en CL
Recuento celular	<5 células nucleadas/ $\mu$ l
Tipo celular (citología)	Mononucleares
Tira de orina	-Proteínas: Trazas/1+ -Glucosa: Trazas/1+ -Sangre: negativo

Tabla 1. Mediciones que se incluyen en el estudio basal del LCR y sus resultados en condiciones fisiológicas.

El recuento celular se lleva a cabo con un hemocitómetro como la cámara de Neubauer. En primer lugar es necesario centrifugar la muestra para aumentar la concentración de células, ya que el LCR es un líquido escasamente celular. Se coloca una muestra de LCR sin diluir en la cámara de recuento y se deja reposar 5 minutos para que las células sedimenten (Villiers y Blackwood 2009). Es necesario contar en las dos cámaras al menos 5 cuadrados, el cuadrado central de cada cámara y los cuadrados presentes en las 4 esquinas. El número de leucocitos y eritrocitos que contemos entre las dos cámaras supone el recuento total de células por  $\mu$ l (Platt y Olby 2004). El recuento anormalmente alto de leucocitos en LCR se denomina pleocitosis y se puede asociar a un aumento conjunto de las proteínas. Cuando el aumento de la concentración de proteínas no va unido a pleocitosis se denomina disociación albuminocitológica y ocurre en lesiones compresivas extradurales, siringomielia, necrosis, procesos infecciosos de origen vírico y mielopatía degenerativa principalmente. La pleocitosis se clasifica en 4 tipos en función de la estirpe de leucocitos más presente en la muestra y cada tipo se puede relacionar con diferentes patologías. Sin embargo, hay patologías que pueden presentar diferentes tipos de pleocitosis, por lo que usaremos todo el examen clínico del animal para establecer el diagnóstico diferencial (Tipold 2003, Platt y Olby 2004, Villiers y Blackwood 2009):

- Pleocitosis linfocítica: Se considera pleocitosis linfocítica cuando más del 50% de los leucocitos son linfocitos. Suele asociarse a infecciones víricas como el moquillo o la rabia, infecciones parasitarias como

toxoplasmosis o neosporosis, infecciones bacterianas como ehrlichiosis, meningoencefalitis necrotizante o granulomatosa y linfoma del SNC. También podemos encontrar este tipo de pleocitosis en la fase crónica de la meningo-arteritis responsiva a esteroides.

- Pleocitosis neutrofílica: Los neutrófilos representan la población más abundante en el LCR y pueden estar degenerados o no. Es típica de la fase aguda de la meningo-arteritis responsiva a esteroides y de meningitis bacteriana. En este último caso es necesario ver al microscopio las bacterias intracelulares. En los casos de pleocitosis neutrofílica puede estar indicado el cultivo de LCR.
- Pleocitosis mixta: En este tipo de pleocitosis encontraremos una combinación de linfocitos y células mononucleares fagocíticas en concentraciones similares, con una población de neutrófilos variable. La pleocitosis mixta es frecuente en la meningoencefalitis granulomatosa, infecciones fúngicas (criptococosis, aspergilosis), ehrlichiosis, toxoplasmosis, neosporosis y peritonitis infecciosa felina, entre otras.
- Pleocitosis eosinofílica: Este tipo de pleocitosis está descrita en migraciones aberrantes de algunos parásitos como toxoplasma o neospora, meningoencefalitis eosinofílica, criptococosis y neoplasias. También se describe en algunos procesos inflamatorios como la meningoencefalitis del Greyhound.

En el caso de tumores también podemos observar diferentes tipos de pleocitosis y poblaciones celulares con criterios de malignidad. Sin embargo, para observar las células tumorales en el LCR es necesario que el tumor sea exfoliativo y en raras ocasiones se consigue una muestra suficiente para llegar al diagnóstico asertivo del tipo concreto de tumor. Los meningiomas suelen producir una pleocitosis neutrofílica, mientras que el linfoma o linfosarcoma lleva asociada una pleocitosis linfocítica con mezcla de linfocitos normales y células linfoides de gran tamaño y degeneradas (Tipold 2003).

Cuando en el LCR aparece sangre es necesario determinar si la hemorragia es iatrogénica o patológica, ya que la concentración de proteínas y células puede verse

alterada por la contaminación sanguínea. Existen fórmulas de corrección (no siempre fiables) tanto para corregir la concentración de proteínas, restando 1mg/dl de proteínas por cada 1000 eritrocitos/ $\mu$ l, así como para corregir el recuento leucocitario, restando 1 leucocito/ $\mu$ l por cada 500 eritrocitos/ $\mu$ l (Platt y Olby 2004). Si al obtener la muestra el LCR es uniformemente rojo, es más probable que se trate de una hemorragia patológica. En la hemorragia iatrogénica vemos la sangre en las primeras gotas de LCR. Sin embargo, la cantidad de sangre en la muestra va disminuyendo durante el procedimiento (De la Hunta y Glass 2009). Si al centrifugar la muestra en una citocentrífuga obtenemos un sobrenadante claro y transparente, la hemorragia habrá sido causada por el procedimiento. En el caso de que al centrifugar el LCR el sobrenadante sea amarillento-anaranjado (xantocromasia), esto implica la presencia de productos de degradación de la hemoglobina y, por lo tanto, que la hemorragia es patológica (De la Hunta y Glass 2009). No obstante, el método de elección para diferenciar entre hemorragia patológica o iatrogénica es la citología. La hemorragia será patológica cuando al microscopio se observen eritrofagocitosis, hemosiderófagos y hematoidina/hemosiderina (cristales de bilirrubina). En ausencia de estos hallazgos, la contaminación con sangre se considerará iatrogénica (Platt y Olby 2004).

Además de la determinación de proteínas durante el análisis bioquímico, es posible medir de forma rutinaria parámetros como el nivel de glucosa,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ , y enzimas [creatin kinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST), y lactato deshidrogenasa (LDH)]. De forma fisiológica, en el LCR hay un 60 - 70% de los valores de glucosa en sangre periférica. Ésta pasa del plasma al LCR por difusión pasiva o mediante transporte facilitado (Di Terlizzi y Platt 2006). Cuando los valores de glucosa en el LCR son significativamente más bajos se relaciona con un aumento del consumo intratecal, generalmente relacionado con infecciones bacterianas (Bernardini 2010).

El  $\text{K}^+$  y el  $\text{Ca}^{+2}$  se encuentran en concentraciones ligeramente más bajas en LCR que en plasma ( $\text{K}^+$  3 mmol/L en LCR frente a 3.5-5 mmol/L en sangre) ( $\text{Ca}^{+2}$  1-1.5 mmol/L en LCR frente a 2-2.75mmol/L en sangre). El  $\text{K}^+$  es esencial para el buen funcionamiento neuronal y una correcta liberación de neurotransmisores al espacio sináptico. La elevación o disminución significativa de los niveles de  $\text{K}^+$  en sangre presenta escasos efectos sobre la concentración de  $\text{K}^+$  en LCR. Cuando se eleva el  $\text{K}^+$  en LCR se intercambia de forma activa con  $\text{Na}^+$  a nivel del plexo coroideo. De forma

similar, las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  total en LCR son independientes de su concentración plasmática. El  $\text{Ca}^{+2}$  es secretado de forma activa por el plexo coroideo y reabsorbido a nivel de BHE (Di Terlizzi y Platt 2006).

El  $\text{Na}^{+2}$ , con una concentración similar a la del plasma, es el electrolito más abundante en el LCR. Forma parte de los mecanismos de osmorregulación y participa en el mantenimiento del potencial de membrana. El  $\text{Cl}^{-}$  y el  $\text{Mg}^{+}$  se encuentran en concentraciones en LCR ligeramente superiores a las del plasma. Ambos iones pasan a LCR por difusión pasiva e intervienen en la conducción neuronal (Tipold 2003, Di Terlizzi y Platt 2006).

En el LCR también podemos encontrar enzimas procedentes del tejido nervioso, de la sangre o de las células presentes en el propio líquido. La concentración de CK en LCR es independiente de su concentración en sangre, por lo que los aumentos significativos de CK en LCR son indicativos de alteraciones estructurales del tejido nervioso, ya sea por una extensa degeneración de la mielina o por daños directos contra el parénquima (tumores, procesos inflamatorios, infecciosos o inmunomediados, entre otros) (Di Terlizzi y Platt 2006).

### 3.2.3 Marcadores de enfermedad y biomarcadores medidos en líquido cefalorraquídeo

El término biomarcador, tal y como lo conocemos actualmente, se emplea en publicaciones científicas desde hace tan solo 15-20 años. En publicaciones anteriores podemos encontrar términos como marcadores subrogados, marcadores biológicos, marcadores intermediarios, o productos finales subrogados, entre otros muchos (Aronson y Ferner 2017). La primera definición de ‘biomarcador’, propuesta en el año 2000 por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, contempla que se considera biomarcador toda aquella característica que se pueda medir de forma objetiva, que pueda ser evaluada como indicador de un proceso biológico fisiológico, patológico o respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Fitzgerald (2016) propone una definición menos ambigua de biomarcador, definiéndolos como variantes funcionales o índices cuantitativos de un proceso biológico, el cual estima la predisposición de un determinado paciente a sufrir una enfermedad, prediciendo su evolución y su respuesta al tratamiento.

El uso de biomarcadores ofrece grandes ventajas ya que permiten predecir la evolución de una enfermedad y facilitan el tratamiento precoz. Los biomarcadores permiten llevar a cabo estudios farmacológicos con gran celeridad. Hace unas décadas, para evaluar la seguridad de un nuevo fármaco era necesario el empleo del método ensayo-error, poniendo en riesgo la vida del sujeto control. Actualmente se ha resuelto este problema mediante el uso de biomarcadores a nivel sérico que permiten establecer rangos de seguridad de forma rápida y con menos riesgos para el paciente. Los biomarcadores también son empleados en la estadificación del cáncer para determinar su mortalidad o predecir la respuesta a una determinada medicación. Si una intervención terapéutica modifica sustancialmente un biomarcador, ésta puede ser considerada como una terapia efectiva en el caso de que los valores del biomarcador vuelvan a su rango fisiológico. Al contrario, también se puede determinar si un tratamiento es inefectivo o tóxico cuando el biomarcador se aleja más de la normalidad (Aronson y Ferner 2017).

La elección de un biomarcador se hace en relación a su capacidad de cambio con respecto a la enfermedad. Conociendo el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad se puede encontrar el biomarcador a nivel molecular, celular, tisular u orgánico que mejor se adapte a la enfermedad o tratamiento instaurado. El mejor biomarcador es

aquel que pronostica de forma acertada y sin estar sujeto a variabilidad individual el desenlace de una enfermedad, cambia rápidamente cuando la enfermedad mejora o empeora y se afecta mínimamente por circunstancias externas, como errores laboratoriales o diferentes métodos de tomas de muestras. Además, debe ser un proceso barato, fácil de llevar a cabo y que aporte resultados rápidamente (Aronson y Ferner 2017). Aronson (2012) propone varios escenarios en los que un biomarcador puede ser más acertado para monitorizar la evolución del tratamiento o el pronóstico de la enfermedad. En los casos de infarto de miocardio y de ictus cerebral, el nivel de colesterol en sangre era utilizado como biomarcador con capacidad de predecir la enfermedad en pacientes humanos con altos niveles de lípidos en sangre. Se ha demostrado que sólo el 10% de los pacientes con niveles de colesterolemia por encima del rango fisiológico padecen la enfermedad, por lo que el colesterol es un indicador poco fiable de la probabilidad de sufrir un infarto o ictus. Esto pone de manifiesto la existencia de otros factores que pueden desencadenar el proceso patológico. No obstante, los niveles de colesterol sí se utilizan de forma fiable en la monitorización de la respuesta al tratamiento. Si un biomarcador no cumple todos los requisitos, deben emplearse varios marcadores para observar la evolución del proceso patológico.

En medicina humana, en el ámbito de la neurología, se emplean diversos biomarcadores en LCR con valor pronóstico de la evolución de la lesión medular. Entre ellos destacan la proteína S100b, enolasa neuronal específica, proteína ácida fibrilar glial y neurofilamentos de cadena ligera.

Las proteínas S100 son una familia de proteínas moduladoras del  $\text{Ca}^{+2}$ , están presentes en los vertebrados tanto a nivel intracelular como extracelular. A nivel intracelular están implicadas en diferentes reacciones enzimáticas como la fosforilación, están presentes en el citoesqueleto, participan en la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  y en la proliferación y diferenciación celular. Las proteínas S100 a nivel extracelular promueven la proliferación de astrocitos, la diferenciación neuronal, permiten la apoptosis de las células nerviosas y estimulan o inhiben la actividad de células inflamatorias (Van Dongen y col. 1999, Ma y col. 2001).

La proteína S100b es un biomarcador derivado de las células de glía que se encuentra exclusivamente en LCR ya que no atraviesa la BHE. Es uno de los biomarcadores más estudiados en el caso de traumatismo medular, ya que al dañarse la

BHE, la proteína S100b puede encontrarse también en suero. Sin embargo, su fiabilidad es mucho más alta cuando se mide en LCR (Donato 1986, Keen 2014). Estudios como el de Ma y col. (2001) determinan la concentración de S100b en suero en 144 ratas con daño medular inducido, haciendo mediciones a las 3-12-72 horas tras la lesión. Encontraron un aumento de 5 veces sobre el rango normal de proteína S100b a las 72 horas. Cao y col. (2008) realizaron mediciones en suero y LCR en 80 ratas, encontrando un aumento significativo en LCR con respecto al suero desde las 2 horas post-lesión medular, alcanzando un pico de máxima concentración de S100b a las 6 horas. No solo un daño medular traumático como una hernia discal puede provocar el aumento de S100b. Estudios como el de Van Dogen y col. (1999) demuestran que la hipoxia tisular a nivel medular cursa con un aumento progresivo de S100b en LCR. En este estudio llevan a cabo una cirugía torácica para resolver un aneurisma aórtico en 8 pacientes humanos. Realizan mediciones tanto en suero como en LCR en quirófano, antes de ligar la aorta, durante la propia ligadura, 5 minutos después de la reperusión, durante el cierre de la piel y a las 24 horas post-cirugía. La S100b en suero permaneció constante mientras que en LCR se alcanzan los valores más altos a los 5 minutos de la reperusión. Uno de los 8 pacientes presentó paraplejia como complicación post-operatoria. En este paciente los valores de S100b en LCR continuaron aumentando hasta la medición a las 24 horas después de la cirugía. Resultados similares obtienen Kunihara y col. (2001), Winnerkvist y col. (2007) y Khaladj y col. (2008). Otras enfermedades que ocasionan el aumento de la proteína S100b en LCR son el empiema epidural o tumores que provoquen compresión medular (Marquardt y col. 2004). La proteína S100b puede ser utilizada como un indicador sensible y temprano del daño medular asociado a isquemia del parénquima nervioso (Van Dongen y col. 1999). No obstante, existe controversia en cuanto a la utilidad de la proteína S100b ya que ha sido detectada en ratas con fractura femoral sin afectación del SNC o atletas sin signos clínicos de alteración del SNC (Anderson y col. 2008).

La enolasa neuronal específica (NSE) es una enzima presente en el citoplasma de neuronas y células neuroendocrinas (Cao y col. 2008). Tiende a aumentar tras lesiones medulares, alcanzando picos de máxima concentración en LCR a las 6 horas del daño (Kwon y col. 2010). No es un biomarcador tan estudiado como la proteína S100b. Estudios como los de Loy y col. (2005) y Cao y col. (2008) demuestran un aumento de la NSE en función de la severidad del daño y del tiempo pasado desde que

se produjo la lesión medular en ratas. Khaladj y col. (2008) demuestran un aumento de NSE en humanos asociado a cirugía aórtica por isquemia medular. Sin embargo, Brisby y col. (1999) no detectan cambios significativos en pacientes humanos con traumatismo medular asociado a compresión del nervio ciático o hernia discal lumbar. La NSE es un biomarcador útil en la detección de daño tisular medular en su fase aguda y su aumento se correlaciona con una mayor severidad del daño y un peor pronóstico (Loy y col. 2005, Cao y col. 2008).

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es una proteína monomérica localizada en los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos, por lo que está presente sólo en SNC (Guéz y col. 2003). Los neurofilamentos son componentes del citoesqueleto axonal. Están presentes en toda la neurona pero se concentran en mayor densidad en el axón. El neurofilamento está formado principalmente por 4 subunidades: la subunidad de cadena ligera (NFL), de cadena media (NFM), de cadena pesada (NFH) y una  $\alpha$ -internexina (Anderson y col. 2008). La subunidad más ligera forma el núcleo del filamento. Esta subunidad es utilizada como biomarcador de degeneración neuronal en modelos animales (Guéz y col. 2003). El daño en los axones provoca proteólisis y aumento de NFL en LCR (Kwon y col. 2010, Pouw y col. 2009). Diversos estudios utilizan la GFAP como indicador de la severidad del daño en traumatismo medular, TCE, accidente cerebrovascular, desórdenes neurodegenerativos y astrogliosis (Loy y col. 2005, Lubieniecka y col. 2011). Estudios como el de Kwon y col. (2010) demuestran elevaciones significativas de NFL entre 6-24 horas tras traumatismo medular. Brisby y col. (1999) demuestran aumentos significativos de NFL en hernia discal y compresión de raíces nerviosas a nivel lumbar en personas. Ambos biomarcadores, GFAP y NFL, aparecen aumentados en LCR en pacientes humanos con lesión medular cervical aguda (fractura cervical) y con sintomatología neurológica grave (Guéz y col 2003). La NFL no se debe utilizar en suero como marcador fiable para determinar daño axonal ya que solo aparecerá aumentada en suero en casos de disrupción concomitante de la BHE. Anderson y col. (2008) utilizan un ELISA para detectar NFH en suero en ratas sometidas a TCE de diversa gravedad. Encuentran una relación fuertemente significativa entre la severidad del daño y la cantidad de NFH detectada en suero y con el momento de la medición, siendo el pico de mayor cantidad de NFH en sangre a las 48 horas post-trauma. La facilidad para la extracción de sangre

y la rapidez del método utilizado puede suponer una ventaja para la detección del daño axonal y el seguimiento de la evolución del TCE en la clínica diaria.

En medicina humana existen numerosos biomarcadores de enfermedad encefálica que actualmente no pueden ser empleados en veterinaria por la falta de estudios y por la dificultad de medición en la clínica diaria. Existen tests rápidos de aglutinación en látex para la detección de meningitis bacteriana (los polisacáridos de la membrana bacteriana reaccionan con las partículas de látex aglutinándose en casos positivos) e incluso tests rápidos para la detección de microorganismos concretos como *Neisseria meningitides* (Keen 2014). Se han desarrollado biomarcadores en medicina humana como el beta amiloide (AB42), proteína T-TAU y P-TAU para el diagnóstico y diferenciación de Alzheimer, demencia senil y vascular, entre otras (Dubois y col. 2007, Albert y col. 2011).

En medicina veterinaria se lleva a cabo el estudio de biomarcadores básicos [glucosa, proteínas, recuento celular, electrolitos y algunas enzimas (CK, AST y LDH entre otras) (Di Terlizzi y Platt 2006, Witsberger y col. 2012)]. Sin embargo, hasta la fecha no han sido estudiados con la suficiente profundidad biomarcadores específicos en LCR en el perro (Di Terlizzi y Platt 2006, Cunha 2011, Creevy y col. 2013). Witsberger y col. (2012) llevan a cabo un estudio en 54 perros con hernia discal toracolumbar en el que miden en LCR proteína mielínica básica, lactato,  $Ca^{+2}$ , glucosa, CK, AST, proteínas totales (PT) y celularidad. Butterworth y col. (1997) estudian los cambios en LCR del glutamato, glutamina y aminoácidos en perros con shunt porto-sistémico congénito con respecto a un grupo de pacientes control. Caines y col. (2012) realizan un estudio comparativo de los niveles de lactato en LCR y plasma en un grupo de perros con enfermedad intracraneal previamente diagnosticada y un grupo control de perros sanos. Olby y col. (1999) estudian los cambios que se producen en la concentración de glutamato en LCR en perros con hernia discal intervertebral a nivel cervical y toracolumbar, llevando a cabo la extracción de LCR a nivel de CM y/o CL.

En las últimas décadas se han llevado a cabo diversos estudios en medicina veterinaria acerca de las alteraciones en LCR de los marcadores del MEC. Sugi y col. (1975) emplean el lactato, piruvato y estado ácido-base como marcadores de hemorragia intracraneal en perros; Vaagens y col. (1988) utilizan CK entre otros biomarcadores en perros a los que se induce parada cardíaca; Yin y col. (2001) miden glucosa, lactato,

glutamato y piruvato en LCR en perros con hemorragia intracraneal; Creevy y col. (2013) usan glutamato como marcador de epilepsia idiopática en perros. Sabiendo que el LCR está en íntimo contacto con el parénquima encefálico y partiendo de la premisa de que las alteraciones en el tejido nervioso del SNC se van a ver reflejadas en LCR, cabe esperar que el estudio de biomarcadores del MEC refleje de forma directa diversos estados patológicos del SNC.

La elevada diversidad de estudios en medicina veterinaria es indicativa de la creciente iniciativa para la detección de biomarcadores que ayuden en el proceso diagnóstico y terapéutico. No obstante, la heterogeneidad de los estudios publicados hasta la fecha hace difícil la estandarización de biomarcadores que puedan ser utilizados en la clínica diaria, a diferencia de lo que ya ocurre en medicina humana. Por lo tanto, la tendencia de la próxima década debe ir dirigida a la realización de estudios basales para la determinación de rangos fisiológicos de los biomarcadores medidos en LCR, minimizando las variaciones como consecuencia del protocolo anestésico utilizado, las diferencias interraciales, de edad, sexo y la evolución de esos biomarcadores tras un protocolo de tratamiento unificado. De esta manera, reduciendo el sesgo de los datos como consecuencia de las diferentes razas y fármacos empleados para la anestesia o tratamiento, podremos encontrar biomarcadores útiles en la clínica diaria veterinaria.

---

### 3.2.4 Marcadores del metabolismo energético cerebral en el líquido cefalorraquídeo

---

El encéfalo consume el 25% de la glucosa del organismo debido al alto coste energético que supone el mantenimiento del potencial de acción neuronal y la recaptación de electrolitos y neurotransmisores post-sinápticos (Bélanger y col. 2011). El MEC es un proceso compartimentalizado que depende de la acción conjunta de neuronas y astrocitos. Mientras las neuronas son principalmente oxidativas, los astrocitos obtienen energía principalmente mediante la ruta glucolítica (Falkowska y col. 2015). Ambas estirpes celulares se complementan con el objetivo de mantener el alto ratio metabólico del encéfalo. En consecuencia, cualquier enfermedad o tratamiento que interfiera en el delicado equilibrio metabólico cerebral puede ocasionar oscilaciones de los marcadores del MEC.

---

#### 3.2.4.1 Glucosa

---

La glucosa es el principal sustrato metabólico neuronal. De ella depende la obtención de energía de forma directa o indirecta a partir de productos intermediarios como el lactato o piruvato, que por diversas rutas metabólicas darán lugar también a la formación de energía en forma de ATP.

La glucosa alcanza el LCR por difusión o transporte facilitado desde la sangre. Los astrocitos captan la glucosa mediante sus prolongaciones perivasculares y la almacenan en forma de glucógeno (Jaggy 2010). Los valores fisiológicos de glucosa en LCR suponen entre un 60-80% de la glucemia y dependen por lo tanto de los valores de glucosa en sangre, del ratio metabólico neuronal y del grado de saturación de las moléculas transportadoras de glucosa. En situaciones de hipoglucemia la glucosa pasará rápidamente a LCR, mientras que en casos de hiperglucemia, los transportadores se saturan y limitan la entrada de glucosa a través de la BHE (Di Terlizzi y Platt 2006).

En medicina humana se han establecido los rangos fisiológicos de la concentración de glucosa en LCR en función de la edad del paciente. Estudios como el de Leen y col. (2012) analizan la concentración de glucosa en LCR en más de 8.800 pacientes y establecen las diferencias entre rangos de edad. Los neonatos presentan las

mayores variaciones de glucosa debido a los estados de hipo e hiperglucemia atribuibles a nacimientos prematuros, nacidos con un bajo peso corporal y a la inmadurez de su sistema metabólico. Se observa una tendencia creciente, dependiente de la edad, en la glucosa en LCR, ya que los pacientes de más edad presentan valores de glucosa ligeramente superiores, siendo el grupo de pacientes de más de 80 años los que presentan valores mínimos y máximos superiores al resto.

Diversos estudios en medicina humana emplean la glucosa como marcador del MEC (Straus y col. 2006, Bruna y col. 2009, Leen y col. 2010). Straus y col. (2006) estudian el LCR mediante punción lumbar en pacientes con sospechas clínicas de presentar meningitis bacteriana. En el estudio determinan, entre otros valores, la concentración de glucosa en LCR y en sangre y el ratio glucosa LCR/sangre. Ratios de 0,4 o menores pueden ser utilizados como marcadores del MEC en la detección de meningitis bacteriana. El diagnóstico debe ir acompañado de evidencias clínicas y cultivos de LCR y pruebas serológicas. Bruna y col. (2009) llevan a cabo un estudio para determinar diversos factores con valor pronóstico en carcinomatosis leptomeníngea. Encuentran que los pacientes con valores basales de glucosa en LCR por encima de 2,7 mmol/L presentan una supervivencia más larga. Aquellos pacientes con niveles más bajos de glucosa se justifican por un mayor consumo intratecal de glucosa por parte de las células tumorales o como consecuencia de la alteración en el transporte de la glucosa a través de las meninges alteradas por la carcinomatosis. Leen y col. (2010) estudian el síndrome de deficiencia del transportador de glucosa GLUT1 en humanos. Se trata de una enfermedad autosómica dominante por la cual el paciente nace con una baja expresión de este transportador en las células endoteliales de la BHE. Este hecho provoca en el paciente una hipogluorraquia en ausencia de hipoglucemia. La determinación de los niveles de glucosa en LCR y la medición del ratio glucosa en LCR y en sangre les permite diagnosticar la enfermedad sin necesidad de tiempos de espera elevados. La sintomatología clínica, junto con la gluorraquia, son indicativas incluso del subtipo de deficiencia de GLUT1. Para diferenciar pacientes con esta enfermedad de otras patologías causantes de hipogluorraquia también miden las concentraciones de lactato en LCR. En la deficiencia de GLUT1, el tejido nervioso emplea el lactato como fuente de energía, por lo que éste disminuye por debajo de los rangos fisiológicos, mientras que en meningitis y hemorragias subaracnoideas tiende a aumentar.

En medicina veterinaria el número de estudios sobre la glucosa en LCR se reduce y se llevan a cabo en diferentes especies. En consecuencia, resulta difícil llegar a consensos de rangos fisiológicos y variaciones patológicas de la glucosa y otros marcadores del MEC en LCR. Trabajos como los de Kiewert y col. (2010) estudian los cambios metabólicos que se producen en el cerebro de ratas a las que se somete a oclusión de la arteria cerebral medial. En el estudio utilizan técnicas de microdialisis para monitorizar los cambios en la glucosa, glutamato y acetilcolina en el líquido extracelular. Los cambios fisiopatológicos que se producen como consecuencia de un proceso isquémico cerebral incluyen la pérdida directa de fuentes de energía en forma de glucosa y oxígeno. Al disminuir las fuentes de energía se produce una drástica reducción en la formación de ATP, la despolarización y liberación masiva de glutamato y la liberación a espacio extracelular de grandes cantidades de  $K^+$  y  $Ca^{+2}$ , provocando excitotoxicidad y necrosis neuronal. En el estudio concluyen que en el núcleo isquémico, al que apenas llega aporte sanguíneo, los niveles de glucosa se reducen al 5-10% de los valores basales. En la zona de penumbra, parcialmente isquémica y potencialmente recuperable, los niveles bajan a un 40% del basal en el momento 0 pero suben hasta el 75% a medida que se forma neovascularización a la zona de penumbra. Yin y col. (2001) llevan a cabo un estudio semejante en el que evalúan las alteraciones metabólicas en LCR en perros a los que someten a isquemia cerebral mediante la inducción de hemorragia subaracnoidea. De la misma manera observan que en un encéfalo isquémico se produce una reducción significativa de la glucorraquia. Esta caída de los valores de glucosa se puede explicar por varias teorías: un fallo en los transportadores de glucosa (que dependen del ATP), por la disminución del flujo de perfusión cerebral al aumentar la PIC por la hemorragia subaracnoidea o por la liberación masiva de glutamato y el aumento de la demanda de energía que genera este neurotransmisor excitatorio.

Pugliese y col. (2005) llevan a cabo un estudio sobre marcadores del MEC (glucosa, lactato y piruvato) en el LCR de perros con signos clínicos de SDCC. En personas se han descubierto niveles anormalmente altos de lactato y piruvato en pacientes con Alzheimer y con demencia vascular. En perros se observa también esta tendencia en el SDCC. Pugliese y col. (2005) encuentran niveles de lactato y piruvato más altos en el LCR del grupo de perros con déficits cognitivos severos. Los niveles de glucosa muestran una tendencia a aumentar de forma progresiva, mostrando valores más

bajos en el grupo control y en el grupo con signos leves de disfunción cognitiva. El grupo con déficits más pronunciados presenta además un rango de variabilidad mucho mayor que el resto de grupos, ya que algunos pacientes presentan niveles de glucorraquia muy altos. Para dar una explicación a estas variaciones de marcadores del MEC en LCR, los autores del trabajo se fundamentan en la fisiopatología de la enfermedad. La alteración del metabolismo neuronal provoca una reducción en la formación de ATP y un mal funcionamiento de la bomba Na-K-ATPasa, de manera que no hay intercambio de  $K^+$  con el  $Na^+$  intracelular y no se recupera el potencial de membrana. Esto conlleva a un mal funcionamiento neuronal y a procesos neurodegenerativos. No obstante, como se ha descrito en el capítulo 3.1, el metabolismo neuronal es un proceso compartimentalizado en el que actúan neuronas y astrocitos para mantener la alta demanda energética del tejido nervioso. Cuando la neurona no es capaz de afrontar esta alta demanda, los astrocitos nutren a la neurona de otros sustratos metabólicos como el lactato y piruvato. Según Pugliese y col. (2005), el grupo de perros con déficits leves presenta valores de glucosa, lactato y piruvato normales pero más altos que el grupo control, reflejando la capacidad adaptativa del MEC. Los pacientes con déficits cognitivos más graves presentan valores de glucosa, lactato y piruvato más elevados como consecuencia de un metabolismo oxidativo alterado y debido al agotamiento de los mecanismos compensatorios neuronales. De esta manera se justifican unos déficits cognitivos más graves en pacientes con metabolismo oxidativo más alterado.

---

#### 3.2.4.2 Lactato

---

El lactato, un subproducto del metabolismo de la glucosa, procede de la degradación del piruvato, y éste a su vez, de la degradación de la glucosa. El lactato se encuentra en el organismo en forma de dos enantiómeros independientes. El D-lactato es producido por el metabolismo de la glucosa y carbohidratos por parte de las bacterias, preferentemente del tracto gastrointestinal. El L-lactato es el esteroisómero producido por las células de los mamíferos (Pang y Boysen 2007). Se forma principalmente en el músculo, piel, cerebro, eritrocitos (carecen de mitocondria y de la posibilidad de llevar a cabo un metabolismo oxidativo) e intestino (Vincent y col. 2016). En condiciones de aerobiosis,

el piruvato sufre decarboxilación oxidativa en la mitocondria y produce 30-36 moléculas de ATP, CO<sub>2</sub> y agua. Cuando existe hipoxia tisular y alteración del metabolismo mitocondrial, se produce la formación de lactato a partir de piruvato, NADH e H<sup>+</sup>. El lactato se empleará entonces para producir energía por la vía glucolítica produciendo sólo 2 moléculas de ATP por molécula de lactato consumido (Cunha 2011). En los casos en los que haya una reducción del metabolismo celular o una disminución del consumo de lactato se producirá el correspondiente aumento de los niveles de lactato en sangre o LCR (Levy 2006). El lactato producido será metabolizado a piruvato por el hígado y los riñones. El piruvato reconvertido puede ser empleado para generar energía directamente o puede ser captado por los hepatocitos para producir glucogenogénesis y gluconeogénesis (Cunha 2011).

El lactato en el encéfalo es producido localmente por los astrocitos en una reacción bioquímica mediada por el glutamato. Este neurotransmisor excitatorio es necesario para estimular la glucólisis en el astrocito y que éste genere y libere lactato al líquido intersticial. Posteriormente, la neurona captará el lactato como sustrato metabólico anaeróbico para generar energía con la que mantener el potencial de membrana (Smith y col. 2003). El lactato, bajo condiciones fisiológicas de pH, se encuentra en su forma ionizada y no atraviesa la BHE. La concentración de lactato en LCR es por tanto independiente de la concentración en plasma, por lo que los niveles de lactato en LCR se pueden considerar un marcador del MEC fiable en diversas patologías (Pang y Boysen 2007). No obstante, el encéfalo de los mamíferos presenta transportadores específicos de lactato, por lo que parte del lactato circulante puede atravesar la BHE mediante transporte activo dependiente de energía. Para que este transporte se lleve a cabo debe presentarse hipogluorraquia e hiperlactatemia, por lo que el lactato circulante no se puede considerar una fuente de energía fiable para el tejido neuronal (Smith y col. 2003).

Algunos de los campos en medicina humana en los que con mayor énfasis se han estudiado las variaciones fisiopatológicas del lactato en LCR son el envejecimiento y el Alzheimer. Leen y col. (2012), en su estudio para determinar las variaciones de glucosa y lactato en LCR en función de la edad, observan una clara tendencia a aumentar la concentración de lactato en LCR a partir de los 18 años de edad. La medición de las concentraciones de lactato en LCR se considera una herramienta aceptada mundialmente para el diagnóstico de disfunción mitocondrial. Liguori y col. (2015)

llevan a cabo un estudio en pacientes con Alzheimer para intentar relacionar el grado de disfunción cognitiva con los niveles de lactato en LCR. En su trabajo comparan los niveles de lactato en pacientes con Alzheimer y demencia vascular con un grupo control. En el grupo de pacientes con Alzheimer encuentran un aumento significativo de los niveles de lactato en LCR comparado con los otros dos, entre los cuales no hay diferencias. Entre los pacientes afectados de Alzheimer, el subgrupo con déficits cognitivos más severos presenta niveles de lactato inferiores al subgrupo con déficits moderados. Este hallazgo implica que en el progreso de la enfermedad se afectan tanto el metabolismo oxidativo como la ruta glucolítica en diferentes etapas, siendo los estadios más avanzados aquellos en los que mayores alteraciones metabólicas aparecen.

Además del Alzheimer existen otras enfermedades que pueden ocasionar variaciones en los niveles de lactato en LCR. El aumento de la concentración de lactato puede ser causado por enfermedades como las meningitis/meningoencefalitis bacterianas y fúngicas, la tuberculosis, la listeriosis, *status epilepticus*, hemorragias subaracnoideas y cualquier patología causante de hipoxia cerebral (Cunha 2011, Leen y col. 2012). Los niveles de lactato pueden aumentar en función del recuento total de eritrocitos en el LCR (Bailey y col. 1990). Nazir y col. (2017) llevan a cabo un estudio para determinar la utilidad del lactato en LCR como biomarcador que permita una distinción rápida de meningoencefalitis bacteriana y vírica en niños. Mientras que valores de lactato en LCR  $\geq 3$ mmol/L tienen una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de meningoencefalitis bacteriana, valores  $\leq 2$ mmol/L son altamente sugestivos de meningoencefalitis vírica. No obstante, los niveles de lactato deben interpretarse en función de los signos clínicos del paciente y junto a las pruebas convencionales que se realizan en el LCR (recuento total de proteínas, celularidad, concentración de glucosa, cultivo y antibiograma). Bönig y col. (2019) estudian el LCR de 113 pacientes humanos con metástasis leptomenígea. Los niveles de lactato en LCR se muestran elevados en el 68% de los pacientes con tumores bien delimitados y en el 48% de los pacientes con alteraciones hematológicas. El lactato elevado en LCR es utilizado como indicador de mal pronóstico en pacientes con metástasis leptomenígea. Además, Bönig y col. (2019) lo utilizan como marcador para diferenciar casos en los que sólo hay sospecha de malignidad en las células del LCR. Tanto el linfoma como la neuroborreliosis o la meningoradiculitis vírica presentan signos clínicos y citológicos

semejantes, pero los niveles de lactato en estas dos enfermedades infecciosas se presentan elevados en menos del 10% de los casos.

Calabrese y col. (1991) miden los niveles de lactato en LCR en 29 pacientes que han sufrido *status epilepticus*. Toman las muestras de LCR mediante punción lumbar dentro de las 12 horas después del ingreso del paciente en el servicio de urgencias. Los niveles de lactato en LCR aumentan de forma significativa en el grupo de pacientes que sufren una crisis epiléptica aislada en relación al grupo control sano. Los pacientes con *status epilepticus* muestran niveles de lactato significativamente más altos que el grupo con crisis aisladas, siendo los pacientes con peor pronóstico (peor recuperación funcional) los que presentan los valores más altos. No encuentran relación entre la duración de la crisis y los valores de lactato. En el estudio valoran el pH y la PaO<sub>2</sub> con el objetivo de descartar la hipoxia como posible causa del aumento de los niveles de lactato en LCR. Se desconoce por tanto la razón del aumento del lactato durante la crisis epiléptica pero se descarta la hipoxemia como posible causa. Posiblemente el exceso de lactato se produce por la activación de todas las rutas metabólicas para suplir el excesivo consumo de energía durante la crisis. Otra posible explicación a este hecho puede ser el uso de ácidos grasos libres como fuente de energía, ya que durante la crisis se produce su liberación a espacio intersticial de forma masiva (Calabrese y col. 1991).

En medicina veterinaria han surgido en los últimos años numerosos estudios acerca de los niveles de lactato en LCR en diferentes patologías. Ya se ha propuesto como biomarcador en patologías como el SDCC (Pugliese y col. 2005), hemorragia subaracnoidea (Yin y col. 2001) y meningioma (Sullivan y col. 2009). Según estudios como los de Witsberger y col. (2012), el lactato parece no ser un marcador fiable como factor pronóstico de la evolución en pacientes con hernia discal intervertebral aguda. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar la fiabilidad del lactato como biomarcador en LCR.

El trabajo llevado a cabo por Yin y col. (2001) pone de manifiesto las alteraciones metabólicas del SNC en hemorragia subaracnoidea inducida. En el estudio emplean 32 perros a los que se provoca hemorragia subaracnoidea mediante punción en CM. Tras la punción se introduce sangre autóloga en los días 0 y 2 del estudio. Este procedimiento (al igual que las hemorragias subaracnoideas producidas de forma natural) va a provocar un edema encefálico generalizado, aumento de la PIC,

disminución del flujo de perfusión cerebral y de la presión de perfusión cerebral. Al producirse vasoespasmo como consecuencia de la hemorragia, se genera una zona isquémica encefálica con el correspondiente núcleo isquémico y zona de penumbra, dando lugar a la alteración del metabolismo oxidativo. En este momento se activa la vía glucolítica para generar energía, produciendo grandes cantidades de lactato y piruvato. El excesivo piruvato producido pronto satura el ciclo de Krebs, acelerando la glucólisis para generar lactato con el que producir energía. Todos estos daños van a provocar la liberación de glutamato y el aumento de la excitabilidad neuronal. Los autores concluyen que durante el vasoespasmo, tanto el lactato como el piruvato, glutamato y glucosa se ven alterados, con mayor gravedad durante el tiempo del vasoespasmo inducido.

En el estudio de Pugliese y col. (2005) en perros con SDCC encontramos niveles de lactato en LCR muy superiores en el grupo de perros con déficits más severos en relación al grupo control. El lactato no sólo es considerado una fuente de energía para el metabolismo anaerobio sino que se considera además un agente neuroprotector (Gladden 2004, Pugliese y col. 2005). En condiciones fisiológicas, tras la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato, se produce la captación de glucosa por parte de los transportadores GLUT1 de los astrocitos, que metabolizarán la glucosa a lactato. Al mismo tiempo, el glutamato es reconvertido en glutamina (Loaiza y col. 2003). En condiciones patológicas, en las que hay una liberación masiva de glutamato y excitotoxicidad mediada por el excesivo acúmulo de  $Ca^{+2}$  intracelular, se produce la adaptación de las rutas metabólicas. Por un lado, se reduce la actividad de la enzima glutaminasa para producir menos glutamato, y por otro lado, se activa la LDH con el objetivo de facilitar la producción de energía en forma de ATP. Gracias a esta adaptación metabólica de los astrocitos, la neurona puede responder a la alta demanda energética mediada por el glutamato sin necesidad de llevar a cabo un alto metabolismo oxidativo, el cual conllevaría daños irreversibles en la neurona, necrosis y apoptosis. Por lo tanto, el lactato como sustrato metabólico en condiciones de alta demanda energética se considera un mecanismo neuroprotector por parte de los astrocitos (Loaiza y col. 2003, Gladden 2004, Pugliese y col. 2005).

Sullivan y col. (2009) desarrollan un estudio en 85 perros con el objetivo de determinar si la concentración de lactato en sangre en perros anestesiados y diagnosticados de enfermedad intracraneal tiene una importancia clínica relevante.

Encuentran diferencias significativas entre los perros con enfermedad discal intervertebral (EDI), usados como grupo control, y el grupo de perros con hidrocefalia o meningioma. El efecto masa que provocan tanto un tumor intracraneal como una hidrocefalia severa puede provocar hipoxia en el tejido circundante y desencadenar un metabolismo anaerobio con la consecuente liberación de lactato a LCR. Además, el efecto masa y el aumento de la PIC, pueden provocar la liberación endógena de catecolaminas como la norepinefrina y en consecuencia, aumentar la producción de lactato a nivel de circulación periférica. En este estudio, sólo los pacientes con meningioma mostraron niveles de lactatemia por encima de los valores de referencia.

Witsberger y col. (2012) estudian la asociación entre biomarcadores en LCR y la recuperación a largo plazo de perros con hernia discal intervertebral aguda. Para valorar el posible grado de recuperación de la función motora y sensitiva tras una hernia discal, se han utilizado técnicas subjetivas como la valoración del estado nociceptivo en las extremidades antes de someter al paciente a la resolución quirúrgica. Se han desarrollado ratios para valorar la extensión del daño en el parénquima espinal mediante resonancia magnética y relacionarlo con las posibilidades de recuperación (Levine y col. 2009). No obstante, la evaluación de la capacidad nociceptiva presenta escasa sensibilidad en la determinación de la evolución de la hernia discal intervertebral aguda. Witsberger y col. (2012) analizan las variaciones en LCR de glucosa, lactato,  $Ca^{+2}$ , CK y AST con el fin de determinar si estos biomarcadores se pueden relacionar con la presencia de hernia discal intervertebral aguda y si son biomarcadores válidos para predecir la evolución a largo plazo. Utilizan 54 pacientes con esta enfermedad a nivel toracolumbar y 16 perros clínicamente sanos como grupo control. El lactato no muestra alteraciones significativas en estos casos de daño medular agudo. Sin embargo, la CK y proteína mielínica básica pueden ser utilizados como predictores de evolución a largo plazo. Más del 98% de los pacientes con CK y proteína mielínica básica dentro de rango tuvieron una evolución favorable.

Recientemente, Mariani y col. (2019) han publicado un estudio en el que valoran los niveles de lactato en LCR y sangre en 102 perros diagnosticados de enfermedad inflamatoria del SNC (meningoencefalitis granulomatosa, meningoencefalitis necrotizante, leucoencefalitis necrotizante, meningoartritis responsiva a esteroides meningomielitis, meningoencefalitis/meningoencefalomielitis de origen desconocido, y meningoencefalitis infecciosa). El 47% de los pacientes presentaron niveles de lactato

en LCR por encima del rango de referencia, sin estar relacionado de forma significativa con la morbilidad. Mariani y col. (2019) tratan de justificar el aumento del lactato siguiendo el modelo humano de esclerosis múltiple descrito por Regenold y col. (2008), Albanese y col. (2016) y Abdelhak y col. (2017).

La esclerosis múltiple es una enfermedad inmunomediada del SNC. Simone y col. (1996) encuentran una correlación fuerte entre la pleocitosis mononuclear en LCR de pacientes con esclerosis múltiple y el aumento de los niveles de lactato. Aunque Mariani y col. (2019) sólo encuentran una correlación débil entre los pacientes con mayores niveles de lactato en LCR y la pleocitosis mononuclear, puede que los niveles de lactato dependan del grado de activación de los linfocitos, justificado por el efecto Warburg. La glucólisis aeróbica o efecto Warburg consiste en una captación masiva de glucosa por parte de la célula y la producción de lactato en presencia de oxígeno y una correcta función mitocondrial. Esta ruta metabólica alternativa está presente en las células tumorales y algunas células altamente proliferativas como los linfocitos (Almeida y col. 2016, Lu 2019). La glucólisis aeróbica es un método ineficiente para producir ATP en comparación con el metabolismo oxidativo normal en la mitocondria. No obstante, el ratio metabólico de la glucosa por la vía de la glucólisis aeróbica es tan alto que se produce lactato de 10-100 veces más rápido que con la oxidación completa de la glucosa en la mitocondria, produciendo al final cantidades similares de ATP por ambas vías pero produciendo mayores cantidades de lactato por el efecto Warburg (Simone y col. 1996, Lu 2019). Mariani y col. (2019) justifican que sólo el 47% de sus pacientes estudiados presenten niveles elevados de lactato en LCR debido al grado de activación de los linfocitos presentes en los casos con pleocitosis mononuclear. Los linfocitos activados, al igual que las células tumorales, pueden utilizar la vía glucolítica aeróbica. Aunque no está bien definida la razón de este fenómeno, una posible explicación es que el linfocito activo utilice esta vía menos eficiente para producir energía con el objetivo de reservar moléculas de carbono para el metabolismo anabólico en caso de necesidad (Almeida y col. 2016).

Caines y col. (2013) elaboran un estudio para comparar y correlacionar los niveles de lactato en LCR y sangre en pacientes anestesiados con y sin enfermedad intracraneal. Utilizan 60 perros divididos en 3 grupos: un grupo de 11 pacientes con enfermedad intracraneal diagnosticada por RM, un grupo de 10 pacientes sanos a los que se les hace RM por otro motivo no neurológico y un grupo control de 39 pacientes

sanos. Todos los pacientes se anestesian siguiendo protocolos diferentes. El grupo de pacientes con enfermedad intracraneal está constituido por perros con diferentes patologías y diferente gravedad y tratamientos, motivo por el cual los valores de lactato en este grupo presenta un rango muy amplio, aunque con una clara tendencia a presentar valores de lactato más altos que los otros dos grupos. A pesar de los pocos casos que incluyen en el estudio, son capaces de establecer un rango de referencia para el lactato en LCR usando los dos grupos de pacientes sanos (1,1-2 mmol/L). Concluyen además que en ausencia de pruebas complementarias, en los casos en los que la extracción de LCR esté desaconsejada por el riesgo que supone, la medición de lactato en sangre puede usarse como predictor de la severidad de la enfermedad.

El estudio de Caines y col. (2013), así como el de Sullivan y col. (2009), introducen un nuevo punto de vista a tener en cuenta en la medición de los niveles de lactato y otros biomarcadores en medicina veterinaria. Mientras que en medicina humana la extracción de LCR se realiza con el paciente sin anestésico, en medicina veterinaria el proceso debe llevarse a cabo bajo anestesia general. Además, en muchas ocasiones la extracción se realiza tras otras pruebas complementarias como RM o TC, alargando el tiempo anestésico y la posible influencia que puedan tener los agentes anestésicos en los diferentes biomarcadores.

Horn y Klein (2010) elaboran un estudio mediante microdiálisis transcraneal en el *corpus striatum* de ratones de experimentación. Los objetivos del estudio fueron determinar si los niveles de determinados biomarcadores en LCR, (lactato, glucosa, piruvato y glutamato), medidos en tiempo real, en ratones expuestos a diferentes protocolos anestésicos, varían en función del agente anestésico utilizado. El lactato aumenta hasta el 392% de los valores basales tras 75 minutos de anestesia con isoflurano, aumentando rápidamente tras la inducción anestésica y volviendo a valores normales a los 40 minutos de terminar la anestesia. Este incremento es dosis-dependiente. Situaciones parecidas se repiten cuando usan halotano o sevoflurano, obteniendo valores de lactato ligeramente inferiores con sevoflurano. La ketamina, xilacina e hidrato de cloral producen aumentos moderados y transitorios de los niveles de lactato en LCR. El pentobarbital no interfiere en los niveles de lactato ni de glucosa, mientras que el propofol sólo causa un ligero aumento de la glucorraquia. Los autores estudian también los niveles plasmáticos de todos estos biomarcadores durante la anestesia y la relación que pueden guardar esas variaciones tanto en LCR como en

sangre. Al igual que ocurre con los anestésicos volátiles, el lactato en sangre aumenta significativamente tras el uso de isoflurano y halotano, siendo más leve (pero aun así significativa) la elevación de lactatemia con sevoflurano. Ketamina, xilacina, hidrato de cloral y propofol no provocan variaciones en los niveles de lactato en sangre, mientras que el pentobarbital lo disminuye. El mecanismo de acción de los gases anestésicos a nivel del metabolismo celular sigue siendo desconocido. Para Horn y Klein (2010), la hipoxia o isquemia neuronal no parece ser la responsable de la excesiva liberación de lactato porque la saturación de oxígeno permanece estable durante toda la anestesia. Además, en los casos de isquemia cerebral, la elevación del lactato debe ir acompañada de una disminución brusca de los valores de glucosa y un aumento del glutamato, cosa que no sucede en este estudio. Concluyen que la explicación más probable es la interacción de los gases anestésicos con la respiración mitocondrial, bloqueándola y obligando a la célula a obtener energía por rutas anaeróbicas alternativas.

---

#### 3.2.4.3 Piruvato

---

La alteración del metabolismo del piruvato juega un papel importante en el desarrollo de múltiples enfermedades como el cáncer, fallo cardíaco o enfermedades neurodegenerativas (Gray y col. 2014). Conocer la fisiopatología del metabolismo del piruvato permite, por lo tanto, elaborar estudios para desarrollar técnicas para el diagnóstico temprano y permite también mejorar los protocolos de tratamientos de numerosas enfermedades.

El piruvato es el producto final de la degradación de la glucosa y una molécula fundamental en el metabolismo de las células eucariotas. Forma parte de numerosas vías catabólicas y anabólicas como la gluconeogénesis, lipogénesis, síntesis de colesterol y el sustrato fundamental del metabolismo oxidativo mitocondrial.

El piruvato sufre un metabolismo citosólico y mitocondrial. El piruvato almacenado en el citoplasma procede de la oxidación de lactato mediante la enzima LDH, de la transaminación de la alanina por la alanina aminotransferasa (ALT) o como

producto final de la ruta glucolítica, reacción mediada por la piruvato kinasa (PK) (Gray y col. 2014).

La PK es una enzima especialmente importante en células con elevado gasto energético como las células musculares o en células que carecen de mitocondria para llevar a cabo un metabolismo oxidativo, como son los eritrocitos. La PK cataliza la defosforilación del fosfoenolpiruvato en piruvato, dando lugar a dos moléculas de piruvato y dos de ATP por glucosa consumida (Gray y col. 2014). De esta manera, ante una alta demanda de energía, como puede ser un ejercicio físico intenso, las células musculares pueden disponer de piruvato para iniciar el ciclo de Krebs, sobre todo en situaciones en las que la fosforilación oxidativa es insuficiente para producir el ATP necesario (Zanella y col. 2007). Lo pacientes con deficiencia de la PK, en concreto de la isoenzima eritroide, están predispuestos a anemia hemolítica como consecuencia del déficit de formación de ATP, lo que provoca la escasa viabilidad de los eritrocitos formados (Zanella y col. 2007).

La LDH es una enzima fundamental en la ruta glucolítica. Esta enzima lleva a cabo la reducción de la mayor parte del piruvato citosólico en L-lactato y  $\text{NAD}^+$  y  $\text{H}^+$ . De esta forma, aporta los intermediarios necesarios para la ruta glucolítica (Quistorff y Grunnet 2011). La LDH está presente en grandes cantidades en el músculo. El lactato producido en la musculatura es excretado de las células al torrente circulatorio y es captado por los hepatocitos, donde la LDH vuelve a convertir el lactato en piruvato (ciclo de Cori) para iniciar de nuevo el ciclo de Krebs y gluconeogénesis.

La ALT cataliza la transaminación de la alanina (aminoácido precursor de la gluconeogénesis) y  $\alpha$ -ketoglutarato (intermediario del ciclo de Krebs) para formar glutamato y piruvato. El ciclo de la alanina, similar al ciclo de Cori pero menos eficiente energéticamente, comienza en el músculo. La ALT convierte el piruvato en alanina, ésta sale a circulación sistémica y será captada por el hepatocito para convertirlo de nuevo a piruvato e iniciar el ciclo de Krebs (Gray y col. 2014).

En el metabolismo mitocondrial del piruvato, éste será transportado desde el citosol hasta el interior de la mitocondria mediante transportadores de piruvato mitocondriales (TPM). El piruvato pasa por difusión pasiva del citoplasma celular al espacio intermembrana mitocondrial. La membrana mitocondrial interna es

impermeable para mantener el gradiente de protones necesarios para la fosforilación oxidativa. Los TPM permiten el paso del piruvato desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial, donde va a sufrir diversas reacciones bioquímicas. La mayor parte del piruvato será empleado por la enzima piruvato deshidrogenasa para producir acetilcoenzima A (acetil-CoA), NADH y CO<sub>2</sub>. La acetil-CoA pasará al ciclo de Krebs, lipogénesis, formación de colesterol o formación de acetilcolina. El NADH producido será empleado para mantener el gradiente de protones necesario para la fosforilación oxidativa, ayudando al correcto equilibrio metabólico celular (McCommis y Finck 2015).

En medicina humana se han desarrollado numerosos estudios acerca de las alteraciones del metabolismo del lactato y su relación con determinadas enfermedades. El cáncer en general es una de las patologías en las que más ampliamente se investigan las repercusiones que pueden tener las alteraciones en el metabolismo del piruvato y del lactato. El efecto Warburg constituye un claro ejemplo de cómo el metabolismo anómalo del lactato y piruvato es utilizado por las células tumorales para sobrevivir a los mecanismos de defensa del organismo. Como se describió anteriormente en el apartado del lactato (3.2.4.2), las células tumorales van a cambiar el metabolismo oxidativo por la glucólisis aerobia. Algunas de las células tumorales van a emplear esta ruta metabólica para producir un exceso de lactato. Este lactato será captado por las células tumorales de la superficie con el objetivo de transformarlo en piruvato y obtener energía mediante fosforilación oxidativa mientras que se reserva la mayor parte de la glucosa para las células tumorales más profundas. Además, la excreción del lactato por las células tumorales va unida a la salida de protones al espacio extracelular, lo que contribuye a acidificar el medio. Esta acidificación protege las células tumorales de los linfocitos T-citotóxicos, encargados de la destrucción y eliminación de las células dañadas (Chuen Choi y col. 2013, Gray y col. 2014, Lu 2019).

Las enfermedades neurodegenerativas son otro de los grupos de enfermedades más estudiados en lo que respecta a las alteraciones del metabolismo. El cerebro consume el 20-25% de la glucosa total empleada por el organismo en el mantenimiento de las funciones vitales. Por lo tanto, las alteraciones del MEC van a provocar un mal funcionamiento neuronal y un amplio rango de severidad en los déficits neurológicos (Gray y col. 2014). Parnetti y col. (1995) estudian los niveles de lactato, piruvato y glucosa en LCR de 53 pacientes con demencia senil asociada a Alzheimer y las

comparan con un grupo control de 23 sujetos de edades parecidas al grupo a estudio pero sin signos clínicos de disfunción cognitiva. Encuentran una correlación significativa entre los pacientes con mayor déficit cognitivo y aquellos que presentan mayores niveles de piruvato en LCR. Concluyen que el piruvato en LCR puede emplearse como un biomarcador temprano de enfermedad y directamente asociado a la severidad de los signos clínicos. El Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más comúnmente diagnosticada tras el Alzheimer. En la enfermedad de Parkinson, las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, sufren una degeneración como consecuencia de la excesiva producción de RL derivados del propio metabolismo de la dopamina. La pérdida de estas neuronas provoca los déficits motores característicos del Parkinson (Jankovic 2007). Actualmente se investiga el papel que juegan una serie de genes que regulan el metabolismo del piruvato en estas neuronas dopaminérgicas, ya que en los enfermos de Parkinson, estos genes se encuentran poco expresados (Gray y col. 2014).

Además del cáncer y las enfermedades neurodegenerativas, en medicina humana existen numerosas enfermedades causadas o relacionadas con alteraciones en el metabolismo del piruvato. Miyazaki y col. (1998) estudian los efectos del tratamiento con ACTH en los espasmos infantiles, causados por la alteración de los niveles de piruvato en LCR. Miden los niveles de lactato y piruvato en suero y LCR y observan cómo tras el tratamiento con ACTH ambos niveles aumentan tanto en suero como en LCR junto con la mejoría de los signos clínicos. Li y col. (2018) encuentran niveles de piruvato en LCR elevados en pacientes con hemorragia subaracnoidea y lo relacionan de manera significativa con un pronóstico desfavorable. Plantean el uso del piruvato en LCR como biomarcador temprano con fuerte valor pronóstico.

Aunque en medicina veterinaria existen pocos trabajos de investigación sobre el piruvato en LCR, los estudios que existen presentan resultados semejantes a los publicados en medicina humana. Al igual que Parnetti y col. (1995), Pugliese y col. (2005), en su estudio sobre SDCC, encuentran niveles de piruvato elevados en LCR en los pacientes con signos clínicos más severos. Yin y col. (2001) muestran resultados de los niveles de piruvato en perros con hemorragia subaracnoidea similares a los de Li y col. (2018) realizado en pacientes humanos.

#### 3.2.4.4 Glutamato

---

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio y neuromodulador del SNC de todos los mamíferos. Forma parte de numerosas funciones fisiológicas como neurotransmisor mediador de todas las señales excitatorias del cuerpo y se relaciona con importantes funciones cerebrales como la memoria, aprendizaje y estado cognitivo. Se asocia también a procesos de diferenciación celular e incluso muerte neuronal (Magi y col. 2019). Para llevar a cabo estas funciones, el glutamato activa dos tipos diferentes de receptores celulares: los receptores inotrópicos del glutamato (iGLUR) y los receptores metabotrópicos del glutamato (mGLUR). Los iGLUR se relacionan con los potenciales excitatorios neuronales, mientras que los mGLUR permiten al glutamato introducirse en diferentes procesos celulares como el ciclo de Krebs, la asimilación del nitrógeno, y biosíntesis de nucleótidos, aminoácidos y cofactores (Walker y van der Donk 2016, Magi y col. 2019). Los iGLUR los conforman 3 subfamilias diferentes: los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido propiónico  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y kainato. Los mGLUR son 8, del mGLUR1 al mGLUR8, agrupados en 3 subgrupos. El grupo 1 incluye los receptores mGLUR1 y mGLUR5, el grupo 2 incluye mGLUR2 y mGLUR3 y al grupo 3 pertenecen mGLUR4, mGLUR6, mGLUR7 y mGLUR8. Cada una de estas subfamilias presenta sensibilidades diferentes a las concentraciones de glutamato en espacio extracelular (Reiner y Levitz 2018). La elevada cantidad de receptores dependientes del glutamato, presentes tanto a nivel extra como intracelular, pone en evidencia la complejidad de las rutas bioquímicas que sigue el glutamato en el organismo para asegurar su correcto funcionamiento. Por lo tanto, todo proceso patológico que interfiera en alguna de estas rutas provocará una cascada de fallos metabólicos y una serie de signos clínicos asociados.

El glutamato se produce por dos vías metabólicas diferentes. Una ruta incluye la activación de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) para producir la amino-reducción (dependiente de amonio) del 2-oxoglutarato (intermediario del ciclo de Krebs) a glutamato. La segunda ruta depende de la enzima glutamato sintetasa (GLUS), que cataliza la amino-reducción (dependiente de la glutamina) del 2-oxoglutarato a glutamato. Ambas reacciones son reversibles, permitiendo que el glutamato pase de nuevo a 2-oxoglutarato, con las moléculas de carbono necesarias para formar parte del

ciclo de Krebs y permitir la formación de energía a partir del glutamato (Walker y van der Donk 2016).

Aunque el glutamato juega un papel fundamental como neurotransmisor y neuromodulador, la sobre-activación celular como consecuencia de un exceso de glutamato en el espacio extracelular va a provocar la entrada masiva de  $\text{Ca}^{+2}$  a la célula, causando necrosis intracelular y apoptosis. Como no existen enzimas conocidas que degraden el glutamato en el espacio extracelular, el correcto funcionamiento del glutamato va a depender de que exista un equilibrio entre el glutamato excretado y reintroducido en la célula. Esta recaptación de glutamato va a depender de los transportadores de aminoácidos excitatorios (Magi y col. 2019).

Ribeiro y col. (2017), en su revisión acerca de la relación entre los mGLUR y las enfermedades neurodegenerativas, recopilan las relaciones presentes entre estos receptores y enfermedades como el Alzheimer, Parkinson y enfermedad de Huntington. En el Alzheimer se producen una serie de cambios que condicionan la viabilidad de las neuronas, sobre todo a nivel de la corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado. Se produce la formación y depósito de placas  $\beta$ -amiloide, fosforilación aberrante de proteínas de los microtúbulos y la correspondiente formación de enredos de neurofilamentos. Todos estos cambios van a provocar efectos neurotóxicos, alterando la función mitocondrial, la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$ , induciendo la despolarización de membrana, causando la expresión de genes pro-inflamatorios y la producción de RL. Todo esto conlleva a una muerte neuronal prematura (Guglielmotto y col. 2010). Ribeiro y col. (2017) describen el papel que juegan los 3 grupos de mGLUR en la fisiopatología del Alzheimer. Las placas  $\beta$ -amiloide parecen activar la sobreexpresión de los mGLUR del grupo 1, causando la despolarización masiva neuronal y la incapacidad para recuperar el potencial de membrana. De esta manera, al perder la funcionalidad de las neuronas del hipocampo, se produce la pérdida de memoria y comportamientos aprendidos típica del Alzheimer. La expresión anormal de los receptores del grupo 2 en el hipocampo de pacientes enfermos de Alzheimer sugiere que la sobreexpresión de estos receptores está relacionada con formación y liberación de  $\beta$ -amiloide. El estudio llevado a cabo por Kim y col. (2010) concluye que la utilización de agonistas de los receptores mGLUR del grupo 2 estimula la producción de  $\beta$ -amiloide en terminaciones nerviosas de ratón. Esto sugiere que la utilización de antagonistas de estos receptores puede suponer una futura línea de tratamiento. Este mismo grupo de

trabajo utilizó en otro estudio, un potente inhibidor del grupo 2 consiguiendo una clara recuperación de memoria, efectos ansiolíticos y una disminución de  $\beta$ -amiloide en hipocampo y corteza en ratones. Los mGLUR del grupo 3 se encuentran en terminales presinápticos de neuronas glutaminérgicas y GABAérgicas, por lo que su activación va a reducir la expresión de glutamato y en consecuencia se consideran agentes neuroprotectores.

El Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en el mundo. Se produce por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, causando una disminución de la producción de dopamina sobre todo a nivel del cuerpo estriado (Jankovic 2007). El tratamiento más eficaz es la utilización de 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que restituye los niveles de dopamina en el cuerpo estriado y mejora las alteraciones motoras. No obstante, su utilización de forma crónica causa el síndrome de disquinesia inducida por L-DOPA (Lundblad y col. 2004). Esta disquinesia se produce como consecuencia del desequilibrio que se produce entre la estimulación producida por el glutamato y la liberación de dopamina, por lo que se especula que el uso de fármacos dirigidos a controlar los mGLUR podrían suponer un tratamiento eficaz contra este síndrome (Ribeiro y col. 2017). El uso de antagonistas anti mGLUR5 (del grupo 1) mejora los síntomas motores, mientras que los agonistas mGLUR 2 y 3 (del grupo 2), parecen mejorar los signos cognitivos. El uso de agonistas de los mGLUR del grupo 3 disminuye la liberación de glutamato y GABA, protegiendo a las neuronas de la sobreexcitación típica del Parkinson (Ribeiro y col. 2017).

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa de base hereditaria autosómica dominante (Ribeiro y col. 2017). Está causada por la expansión de un tramo de poliglutamina. La poliglutamina es un fragmento de una proteína formada por la repetición de varios aminoácidos glutamina en cadena. Esto ocurre en condiciones fisiológicas pero cuando la poliglutamina es más larga de lo normal (más de 36 glutaminas consecutivas), se crea una proteína anómala que tiende a agregarse y no desarrolla su función. En la enfermedad de Huntington, esta glutamina se forma en la proteína de Huntington o huntingtina (Li y Li 2004, Ribeiro y col. 2017). La huntingtina sensibiliza los receptores NMDA, provocando la excesiva entrada de  $Ca^{+2}$  en la neurona y su destrucción (Ribeiro y col. 2017). Esta degeneración ocurre sobre todo en el cuerpo estriado y en las capas profundas de la corteza, aunque en las etapas más avanzadas de la enfermedad también aparecen en hipotálamo e hipocampo. Los signos clínicos

característicos de la enfermedad son déficits cognitivos, alteraciones psiquiátricas y desórdenes del movimiento (Li y Li 2004). La estimulación de los mGLUR del grupo 1 provoca una acción sinérgica con los receptores NMDA aumentando la entrada de  $Ca^{+2}$  a la célula. La activación de los mGLUR del grupo 2 y 3 inhibe la liberación de glutamato a nivel presináptico, reduciendo la excitotoxicidad (Ribeiro y col. 2017).

Las alteraciones en el metabolismo del glutamato no solo se relacionan con enfermedades neurodegenerativas, también intervienen en desórdenes psiquiátricos como los trastornos de ansiedad, depresión y estrés. Aunque los factores psicosociales son fundamentales para el desarrollo de estas patologías, la causa última de estas alteraciones es la excitabilidad desproporcionada de los circuitos neuronales mediada por el glutamato. Estudios post-mortem demuestran que pacientes con trastorno bipolar o depresión presentan niveles de glutamato por encima de lo normal en corteza prefrontal frontal y dorsolateral (Crupi y col. 2019). El tratamiento farmacológico de estos trastornos va encaminado a reducir la sobreestimulación mediada por el glutamato sin impedir la correcta transmisión de impulsos nerviosos (Crupi y col. 2019).

Los estudios llevados a cabo en medicina veterinaria también pueden relacionar las alteraciones en el metabolismo del glutamato con determinadas enfermedades. Yin y col. (2001), en su trabajo experimental sobre hemorragia subaracnoidea en perros, encuentran niveles de glutamato anormalmente altos en LCR. En estos casos de hemorragia, el glutamato puede presentarse elevado por el paso libre a través de la BHE alterada o a la liberación masiva por parte de las neuronas destruidas. La toxicidad del glutamato va a depender del estado energético del parénquima nervioso, ya que al no existir enzimas que degraden el glutamato liberado al espacio extracelular, depende de que exista energía para reintroducir el glutamato en la célula (Yin y col. 2001, Ribeiro y col. 2017). Los autores concluyen que el glutamato se puede utilizar como biomarcador de la severidad del daño isquémico neuronal. Kiewert y col. (2010) realizan un estudio semejante en ratas induciendo isquemia cerebral mediante oclusión de la arteria cerebral medial. Encuentran valores inmediatos de glutamato en LCR de hasta 8.000 veces los valores basales en el núcleo isquémico y 10 veces los valores en la zona de penumbra. Los niveles de glutamato descienden progresivamente, encontrando a las 3 horas del daño isquémico valores de glutamato 30 veces superiores a los basales.

Además de los problemas vasculares a nivel intracraneal, las enfermedades inflamatorias también se relacionan con aumentos significativos de niveles de glutamato en LCR en el perro. Pham y col. (2008) llevan a cabo un estudio sobre el metabolismo del glutamato y la expresión de transportadores de aminoácidos excitatorios en perros con meningoencefalitis necrotizante (MEN). En el estudio emplean 8 pacientes con confirmación histopatológica de MEN y 10 beagles sanos como grupo control. Obtienen valores de glutamato en LCR significativamente más altos en el grupo MEN que en el grupo control. En dicho estudio se valora también la concentración de transportadores de aminoácidos excitatorios en astrocitos *in vitro*. Utilizan astrocitos fetales y LCR de pacientes con MEN. Obtienen una baja expresión de estos transportadores, justificando al menos en parte, el hecho de que los niveles de glutamato se mantengan altos en LCR, ya que sin estos transportadores, el glutamato no puede ingresar en la célula. Aunque la causa de la baja expresión de transportadores es desconocida hasta la fecha de publicación del artículo, se piensa que la liberación del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  en el proceso inflamatorio o la de interferón- $\gamma$  e interleuquina- $1\beta$  contribuye a inhibir la recaptación de glutamato.

En cuanto a las alteraciones del metabolismo del glutamato en la epilepsia idiopática (EI), existe aún controversia. El estudio de Podell y Hadjiconstantinou (1997), llevado a cabo en 19 perros con epilepsia, encuentran valores de glutamato en LCR elevados con respecto al grupo control y valores de GABA disminuidos. Ellenberger y col. (2004) analizan el LCR de un total de 129 perros con epilepsia, encontrando resultados contradictorios. Emplean un grupo de 35 perros de raza Labrador Retriever y 94 perros de otras razas. El grupo de labradores presentaba valores significativamente bajos de GABA con respecto al otro grupo y al grupo control. No obstante, los niveles de glutamato no se vieron alterados, sólo encontraron un aumento significativo del glutamato en LCR en los perros del grupo control. Creevy y col. (2013) desarrollan un estudio semejante a los anteriores. En este caso realizan un estudio retrospectivo, recogiendo información almacenada sobre la concentración de glutamato y GABA en LCR en pacientes con EI, utilizando las imágenes de RM de perros con EI con y sin áreas hiperintensas. En dicho estudio, encontraron valores de glutamato superiores a los del grupo control, pero no encontraron diferencias entre los pacientes con áreas hiperintensas en RM y los pacientes sin alteraciones en la resonancia. A pesar de no haber una relación estadísticamente significativa, los pacientes con áreas

hiperintensas son los que presentan mayores valores de glutamato en LCR. Por otro lado, los niveles de GABA fueron mayores, aunque sin significancia estadística, en los pacientes con EI y áreas hiperintensas en RM.

Butterworth y col. (1997) llevan a cabo un estudio en perros con shunt portosistémico congénito y encefalopatía hepática asociada. Investigan las alteraciones en LCR de los aminoácidos relacionados con la transmisión del impulso nervioso en el SNC, encontrando un aumento significativo del glutamato de hasta 3 veces los valores del grupo control. Los signos clínicos de la encefalopatía hepática, como la alteración del estado mental, *head pressing*, vocalizaciones o crisis epilépticas, se pueden relacionar con la alteración de la transmisión nerviosa y la excitotoxicidad causada por los niveles anormalmente altos de glutamato.

Olby y col. (1999) miden la concentración de glutamato en LCR mediante punción en CM o CL en perros con lesiones compresivas medulares a nivel cervical y toracolumbar. Correlacionan los niveles de glutamato con la severidad del daño y el carácter agudo o crónico del daño medular. Los autores del estudio emplean 8 perros sin signos aparentes de compresión medular como grupo control. El grupo a estudio lo componen 24 pacientes con hernia discal intervertebral agudas o crónicas a nivel cervical o toracolumbar. Los niveles de glutamato en LCR del grupo a estudio, obtenidos en CM, se corresponden con los obtenidos en el grupo control. El flujo rostro-caudal del LCR en el SNC justifica el hecho de que en localizaciones craneales a la lesión, no se aprecien alteraciones en el LCR (Chiro y col. 1976). Olby y col. (1999) sí que encuentran alteraciones significativas en los niveles de glutamato a nivel de la CL, correlacionando la severidad del daño medular con los niveles más altos de glutamato. Los pacientes con lesiones agudas presentaron valores de glutamato de 2-10 veces las del grupo control, mientras que los pacientes con lesiones crónicas presentaban niveles de glutamato más altos que los del grupo control, pero solo hasta 2 veces el valor de referencia. Los autores justifican este hallazgo por el hecho de que la vida media del glutamato en LCR es de 5-6 horas. En este estudio se evidenciaron también niveles de glutamato diferentes en función de la distancia entre la compresión medular y el sitio de extracción de LCR. Los pacientes con hernias discales cercanas a CL presentaron mayores niveles de glutamato que los que tenían afectados discos intervertebrales más distantes.

### 3.2.4.5 Creatina kinasa

---

La creatina kinasa (CK) es una enzima de la familia de las guanosina kinasas y está presente en todos los vertebrados, aunque también la encontramos en otros animales. La CK desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles energéticos de las células que presentan grandes demandas de energía de forma intermitente, como son las células de la musculatura esquelética, cardíaca, encéfalo o retina (Wallimann y Hemmer 1994). La creatina intracelular se convierte en fosfocreatina por la vía de la CK. La CK actúa catalizando la transferencia de un grupo fosforilado desde el ATP a la creatina, formando fosfocreatina y ADP (McLeish y Kenyon 2005, Pajares y col. 2013). La CK presenta 4 isoformas diferentes, clasificadas en función de la localización donde fueron aisladas por primera vez. Las dos isoformas citosólicas son la CK muscular (CKM) y la CK encefálica (CKE), las dos isoformas mitocondriales son la CK ubícuota o ácida (CKA) y la CK sarcomérica o básica (CKB) (Kay y col. 2017). Cada isoenzima desempeña una función diferente: las CK mitocondriales transforman la creatina en fosfocreatina, que será el sustrato energético del metabolismo oxidativo, mientras que las CK citosólicas usan la fosfocreatina para convertir el ADP en ATP en las zonas de alta demanda energética, para poder llevar a cabo el ciclo de Krebs. Además, las CK citosólicas pueden transformar el ATP excedente en fosfocreatina para almacenar reservas energéticas (Pajares y col. 2013).

En el encéfalo humano se han encontrado las mayores concentraciones de CKE en la sustancia gris, en concreto en las capas granular y molecular del cerebelo y en el hipocampo. En el tejido nervioso la CKE se relaciona con las vesículas sinápticas. Forma parte del sistema de liberación de neurotransmisores al espacio sináptico y participa en el mantenimiento del potencial de membrana y recaptación de iones junto a la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Wallimann y Hemmer 1994).

En los últimos años se han llevado a cabo estudios en medicina humana para determinar la efectividad de la CK como biomarcador. Papa y col. (2015) realizan un artículo de revisión de biomarcadores medidos en atletas que han sufrido concusión realizando algún deporte reglado. En los estudios recogidos en su artículo, por un lado miden CK y proteína S100 $\beta$  en atletas que han realizado maratón, estando aumentadas justo después de la carrera y disminuyendo en sangre hasta las 20 horas post ejercicio,

donde aparecen ya dentro de rangos fisiológicos. Los niveles de CK aumentaron significativamente en grupos de boxeadores que habían recibido golpes en la cabeza o cuerpo, siendo ligeramente superiores los niveles de CK en el grupo que había recibido golpes en la cabeza. Finsterer y Aliyev (2017) estudian un paciente con una variante de la polineuritis desmielinizante inflamatoria crónica en el que la CK aparece elevada. Esta enfermedad causa un síndrome de neurona motora inferior en las 4 extremidades, provocando la inadecuada contracción de la musculatura de las extremidades, la atrofia muscular neurogénica y la liberación de CK muscular. Hamilton y col. (2020) evalúan la relación entre la CK y la  $\alpha$ -cristalina en el desarrollo de cataratas en pacientes humanos. Encuentran niveles anormalmente altos de CKE, hasta 17 veces por encima de lo normal, en el cristalino de ratas que han nacido con cataratas, sugiriendo una mayor demanda de ATP. La  $\alpha$ -cristalina es una proteína que protege y restaura las enzimas del cristalino. Hamilton y col. (2020) encuentran que el complejo CKE- $\alpha$ -cristalina aumenta entre 19-22 veces en humanos con catarata hereditaria en comparación con un cristalino de un paciente sano.

Un estudio llevado a cabo por Lee y col. (2020) trata de establecer el nivel predictivo de la CK en la aparición de secuelas neuropsiquiátricas tardías tras intoxicación con monóxido de carbono. Se trata de un estudio retrospectivo llevado a cabo en 138 pacientes humanos, de los cuales, 12 desarrollaron secuelas hasta 1 año más tarde. Los niveles de CK van a aumentar en pacientes intoxicados con monóxido de carbono debido a la hipoxia tisular, la reacción inflamatoria y el decúbito prolongado en el caso de pacientes que pierdan la consciencia. Los pacientes que presentaron niveles séricos de CK basales por encima de 1603U/L sufrieron secuelas tardías, por lo que la CK puede ser utilizada como biomarcador predictivo en casos de intoxicación con monóxido de carbono.

La medición de CK en LCR se ha llevado a cabo en diversos estudios en medicina humana. El trabajo llevado a cabo por Wang y col. (2011) mide las concentraciones de CK, troponina I y mioglobina en líquido pericárdico y LCR en pacientes durante la autopsia. Encuentran niveles significativamente altos de CK tanto en líquido pericárdico como en LCR en casos de abuso de metanfetaminas y solo en LCR en casos de muerte por traumatismo agudo craneoencefálico cerrado, sin heridas penetrantes. Dash y Patro (2014) evalúan la eficacia de la medición de CK, LDH y

GGPT en LCR como biomarcadores con valor diagnóstico y pronóstico en meningitis. Seleccionan 44 pacientes con meningitis piógena o tuberculosa y miden niveles de CK en suero y LCR tanto en el momento del ingreso hospitalario como a los 7 días de iniciar el tratamiento. La CK en LCR fue significativamente más alta en los dos grupos de pacientes con meningitis con respecto al grupo control, siendo más altos los niveles en los casos con meningitis tuberculosa. Sin embargo, encuentran niveles de CK mucho más altos en el suero tanto del grupo control como del grupo a estudio con respecto a los niveles de CK en LCR. Al séptimo día de iniciar el tratamiento, los niveles de CK en LCR de ambos grupos habían descendido notablemente, probablemente debido a la mejora en el proceso inflamatorio y a la restauración de la BHE. Los niveles de CK en LCR al inicio del proceso no se correlacionaron con el pronóstico de los pacientes.

Chandler y col. (1988) elaboran un estudio histopatológico en el encéfalo de 4 perros sanos con el objeto de medir las concentraciones fisiológicas de CK y otras enzimas en el tejido encefálico. Para ello recogen muestras de 12 áreas diferentes, detectando la presencia de CKE y CK mitocondriales en todas ellas. Al igual que ocurre en el encéfalo humano, la distribución de CKE no es homogénea, siendo las áreas con mayor concentración el núcleo caudado y la sustancia gris de las cortezas parietal, frontal, occipital y cerebelar. El hipocampo presenta concentraciones de CK intermedias, mientras que la médula espinal y la sustancia blanca de la corteza frontal tienen los niveles más bajos. No encontraron CKM en ninguna de las muestras analizadas. Concluyen que el uso de la CKE como biomarcador del daño encefálico global se puede emplear con valor pronóstico, siendo peor cuanto mayor es la concentración de CKE. Sin embargo, desaconsejan su empleo como indicador de la extensión del daño en accidente cerebrovascular, ya que las grandes diferencias encontradas en las concentraciones de CKE en las diferentes áreas del cerebro hacen difícil estimar la extensión de la zona infartada. Ferreira (2016), en un estudio más reciente, mide valores de CK en LCR con el objetivo de determinar su valor como biomarcador diagnóstico en enfermedades del SNC y SNP. De forma retrospectiva, toman los datos de 578 pacientes admitidos en un hospital de referencia en el servicio de neurología. De los 578 pacientes, 409 sufrían enfermedades encefálicas, 117 medulares y 52 relacionadas con el SNP. Concluye que la medición de CK por sí sola no tiene valor diagnóstico ni determina un área en concreto del daño nervioso. Sin embargo, el autor concluye que los pacientes con niveles altos de CK en LCR se

correlacionaron significativamente con un peor pronóstico. La CK en LCR no presenta correlación con la CK sérica, no se altera con la contaminación sanguínea y no guarda relación significativa con los niveles de proteínas en LCR.

Los estudios llevados a cabo sobre la medición de los niveles de CK en LCR en patologías medulares ponen de manifiesto la importancia de la medición de CK en estos pacientes, tanto como parte del protocolo diagnóstico como para emitir un valor pronóstico. Secer e Yzci (2008) crean un modelo animal de estenosis lumbosacra degenerativa en conejos. Utilizan 15 conejos de experimentación a los que inducen compresión medular lumbar caudal (L6) de forma subaguda con balón quirúrgico. Toman una primera medición de LCR prequirúrgica en L6-L7 y las dos siguientes extracciones se llevan a cabo por encima y por debajo de la estenosis. La isquemia del tejido nervioso provocada tanto por la compresión ejercida por el balón como por la reducción del aporte vascular a la zona estenosada, provoca la destrucción de las células nerviosas y la liberación de CK al LCR. En las mediciones de CK craneales a la compresión, donde el flujo sanguíneo y de LCR es normal, los valores de CK fueron normales. Las mediciones llevadas a cabo en el espacio caudal a la estenosis, donde el flujo de LCR está interrumpido, los valores de CK fueron significativamente más altos que en la medición inicial. Olmarker y col. (1989) demostraron en minipigs de experimentación los efectos de una compresión medular mantenida en el tiempo. Una simple elevación de 10mmHg en la presión intratecal podía provocar la oclusión de más del 50% de las vénulas y una reducción significativa del aporte vascular, con las consecuentes secuelas neurológicas derivadas de la isquemia neural. Si se descarta una compresión medular con TC o RM, la presencia de signos degenerativos en región lumbosacra junto con la medición de CK en espacios caudales a la estenosis pueden ayudar al diagnóstico de estenosis lumbosacra degenerativa en conejos (Secer e Yzci 2008).

Witsberger y col. (2012) llevan a cabo un estudio sobre la relación entre determinados biomarcadores en LCR y la evolución a largo plazo de perros con hernia discal intervertebral aguda. Utilizan un total de 54 pacientes y 16 perros sanos como grupo control. Los niveles de CK en LCR fueron considerablemente más altos en los pacientes con hernia discal intervertebral aguda que no evolucionaron de forma favorable, obteniendo niveles medios de 62 UI/L mientras que los valores de referencia de los perros sanos estuvo en <20UI/L. Los autores concluyen que los pacientes con

valores de CK en LCR  $\leq 38\text{U/L}$  tuvieron 35 veces más de posibilidades de ser ambulatorios a largo plazo, subiendo hasta el 98% de los pacientes con valores de CK en LCR por debajo del rango de referencia.

---

#### 3.2.4.6 Iones/electrolitos

---

Los iones y electrolitos son fundamentales para el mantenimiento del potencial de acción, la despolarización y repolarización de membrana y para la transmisión de impulsos nerviosos. Todas las células del cuerpo tienen un potencial eléctrico, pero la peculiaridad de las células nerviosas y musculares es que pueden cambiar la magnitud y la carga del potencial en base a las señales sinápticas que llegan desde células contiguas o en función del órgano de los sentidos donde se encuentran (Klein y Cunningham 2013). Para entender la importancia de los electrolitos en el funcionamiento del sistema nervioso es necesario conocer la fisiología de la sinapsis y conocer cómo los gradientes iónicos permiten el mantenimiento del potencial de membrana en reposo y el potencial de acción.

La carga eléctrica es similar dentro y fuera de la célula. Sin embargo, la carga negativa se concentra en la cara interna de la membrana citoplasmática mientras que la carga positiva lo hace justo en las inmediaciones de la cara externa, provocando que el interior de la célula esté cargado negativamente, entorno a  $-70\text{mV}$  (milivoltios). El potencial de membrana en reposo se consigue gracias a la interacción del  $\text{Na}^+$  y del  $\text{K}^+$  (Klein y Cunningham 2013). La bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  inicia el intercambio de iones en contra de su gradiente de concentración. Introduce en la célula 2  $\text{K}^+$  por cada 3  $\text{Na}^+$  que saca, contribuyendo a reducir la carga positiva dentro de la célula y sirviendo de base para generar potencial eléctrico. Cada ion tiende a buscar su equilibrio dinámico atravesando la membrana por canales específicos. En el caso del  $\text{K}^+$ , al aumentar su concentración dentro de la célula por la acción de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ , tiende a difundir, a través de canales iónicos de membrana, al espacio extracelular siguiendo su gradiente de concentración. Este intercambio de cargas eléctricas que sufren todos los iones en busca de su equilibrio dinámico es lo que produce la formación de voltaje, el cual se conducirá a través de las membranas generando un potencial eléctrico (Efros y col. 2018). La bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  es dependiente de la energía generada por el

consumo de ATP y se estima que más del 50% de la energía empleada por el encéfalo se destina al buen funcionamiento de esta bomba. Por consiguiente, cualquier patología que genere alteraciones en el metabolismo oxidativo neuronal o variaciones significativas de los niveles plasmáticos de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , provocará graves alteraciones neurológicas (Klein y Cunningham 2013).

El potencial de membrana en reposo puede ser modificado en las células nerviosas y musculares en función del tipo de neurotransmisor liberado en la hendidura sináptica. Los neurotransmisores se encuentran almacenados en las vesículas sinápticas, en el terminal presináptico del axón. Cuando llega el potencial de acción, se activan los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  voltaje-dependientes, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  en el terminal presináptico, y provocando la unión de las vesículas a la membrana presináptica para la liberación de los neurotransmisores a la hendidura (Damkier y col. 2013). El tipo de neurotransmisor liberado puede generar la apertura o cierre de canales iónicos del  $\text{Na}^+$  o del  $\text{K}^+$  en la membrana postsináptica. De esta manera, si entra más  $\text{Na}^+$  en la neurona postsináptica, se producirá una disminución de la carga negativa intracelular, un potencial excitatorio y la despolarización neuronal. Si por el contrario los canales que se abren son los del  $\text{K}^+$ , saldrá  $\text{K}^+$  de la célula y ésta adquirirá una carga más negativa, generando un potencial inhibitorio o hiperpolarización neuronal. De esta forma se evita que la neurona inhibida transmita impulso nervioso a sus células contiguas. Tanto el potencial excitatorio como el inhibitorio disminuyen su intensidad con la distancia al punto donde se generó (Klein y Cunningham 2013).

La concentración de los niveles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  en LCR es diferente a la del plasma, ya que la BHE presenta diferentes grados de solubilidad para estos electrolitos. El  $\text{Na}^+$  es el mayor constituyente de la osmolaridad del plasma y junto con el  $\text{K}^+$  son los principales responsables del movimiento de agua entre espacio intra y extracelular (Damkier y col. 2013). La concentración de  $\text{Na}^+$  en el plasma es regulada por el hipotálamo, que al detectar hipo/hipernatremia, activa mecanismos compensatorios como la liberación de hormona antidiurética (ADH) o la sensación de sed. En caso de hipernatremia, el fluido intersticial tendrá altas concentraciones de  $\text{Na}^+$ , comportándose como un fluido hiperosmolar con respecto al fluido intracelular. Esto provoca la salida de fluido de las células por gradiente de concentración y su deshidratación. Las neuronas son especialmente sensibles a este efecto, por lo que en aumentos bruscos de natremia o valores de  $\text{Na}^+$  por encima de 180mEq/L, aparecerán signos neurológicos

como obtundación, coma, crisis convulsivas y *head pressing* (Silverstein y Hopper 2015). No obstante, el SNC presenta mecanismos de protección frente a estados de hiperosmolaridad. Cuando se pierde volumen celular por la salida de agua libre a espacio intersticial, el  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  del LCR es captado por las neuronas para aumentar su gradiente de concentración de forma rápida. Además, las neuronas empiezan a acumular solutos osmóticamente activos como el glutamato o glutamina de forma más lenta a modo de protección (Silverstein y Hopper 2015).

Tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, el  $\text{Na}^+$  es el electrolito más abundante en el LCR y guarda una relación muy directa con su concentración en el plasma (Di Terlizzi y Platt 2006, Di Bartola 2012). Los niveles de  $\text{Na}^+$  en SNC son controlados principalmente por la bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ , el cotransportador  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  (NBCe2) y por la ruta paracelular en las células con uniones tipo GAP. La bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ , en el plexo coroideo, extrae por transporte activo el  $\text{Na}^+$  de las células hacia el LCR. El cotransportador NBCe2 introduce el  $\text{Na}^+$  desde la sangre hasta las células. Para ello utiliza dos moléculas de bicarbonato por cada  $\text{Na}^+$  que introduce mientras que para sacar un  $\text{Na}^+$  de la célula hacia el LCR emplea el cotransporte de 3 moléculas de bicarbonato. La ruta paracelular intercambia  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  entre la sangre y el LCR de manera menos eficiente que las rutas transcelulares anteriormente descritas (Hladky y Barrand 2016). El estudio llevado a cabo en medicina humana por Ghaffari y col. (2020) pone de manifiesto la importancia de la homeostasis del  $\text{Na}^+$  en el SNC. En su trabajo de investigación sobre la fisiopatología de la migraña, desarrollan un modelo matemático para calcular el movimiento de  $\text{Na}^+$  entre las células y espacio intersticial a través de la BHE y la barrera LCR-sangre. Concluyen que, si bien no se conoce la causa última que desencadena la migraña, pueden asegurar que el aumento de  $\text{Na}^+$  en parénquima encefálico y LCR provoca una hiperexcitabilidad neuronal que desencadena la migraña.

En medicina veterinaria existen pocos estudios que relacionen alteraciones en la concentración de  $\text{Na}^+$  en LCR con diversas enfermedades neurológicas. Sullivan y col. (2003) estudian un caso de un Schnauzer miniatura de 9 meses de edad con hipernatremia hipodipsica. El paciente presenta una historia clínica en la que no suele beber de forma voluntaria y ha presentado signos neurológicos como ataxia o cambios de comportamiento. En las pruebas diagnósticas detectan una hipernatremia severa ( $>180\text{mEq/L}$ ) y la TC detecta hidrocefalia congénita. En la necropsia se detecta

holoprosencefalia lobar, justificando los cambios comportamentales y la hipodipsia como consecuencia de la falta de desarrollo del hipotálamo y sistema límbico. En el estudio de casos llevado a cabo por Hanselman y col. (2006) evalúan un paciente Golden Retriever hembra de 6 años con debilidad, ataxia, amaurosis, hiporexia e hipodipsia. En las analíticas encuentran valores de  $\text{Na}^+$  en plasma de 193 mEq/L y en LCR valores de 189 mEq/L. El  $\text{Cl}^-$  también apareció aumentado mientras que el  $\text{K}^+$  estaba dentro de rango fisiológico tanto en plasma como en LCR. En la necropsia se diagnosticó un linfosarcoma sistémico difuso, afectando a todo el encéfalo, incluido hipotálamo, y a bazo, hígado y riñones. La afectación hipotalámica justifica la destrucción de osmorreceptores y la falta de sensación de sed, explicando la hipernatremia con la que llegó al centro de referencia. Un caso parecido es descrito por Mackay y Curtis (1999) en un Doberman de 7 años con agresividad y obtundación. El paciente presentó severa hipernatremia y fue diagnosticado de meningoencefalitis granulomatosa afectando núcleos hipotalámicos. En este caso no se midieron los niveles de  $\text{Na}^+$  en LCR.

El 99% del  $\text{K}^+$  del cuerpo se encuentra a nivel intracelular, representando hasta 140mEq/L frente a los 4mEq/L de media en el plasma. El  $\text{K}^+$  es fundamental para el mantenimiento del potencial de membrana en reposo y la instauración de un potencial de acción que permita a las células musculares contraerse (Silverstein y Hopper 2015). La concentración de  $\text{K}^+$  en LCR (3mEq/L) es menor que la del plasma (3,6-5mEq/L). En situaciones de hiperkalemia, los niveles de  $\text{K}^+$  en LCR se mantienen constantes por la elevada impermeabilidad de la BHE (Di Terlizzi y Platt 2006). Cuando aumenta el  $\text{K}^+$  en LCR, éste es intercambiado por la bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$  a nivel de plexos coroideos, intercambiando 2  $\text{K}^+$  por cada 3  $\text{Na}^+$  que saca de la célula. El cotransportador de cloruro potásico ( $\text{KCC3}$ ), integrado en la ruta paracelular, es el mediador encargado del transporte de  $\text{K}^+$  desde las células epiteliales a la sangre. Se trata de un cotransportador con  $\text{Cl}^-$  que actúa sacando  $\text{K}^+$  de las células cuando su concentración intracelular es igual o superior a 1 en su relación con la concentración extracelular. A nivel de plexos coroideos, las uniones intercelulares permiten el paso de cationes de  $\text{K}^+$  desde el interior de las células hacia el LCR siguiendo su gradiente de concentración (Hladky y Barrand 2016).

En el estudio llevado a cabo por Pugliese y col. (2005) en perros con SDCC encuentran niveles anormalmente altos de  $\text{K}^+$  en LCR, al igual que elevaciones en los

niveles de glucosa, lactato y piruvato, en el grupo de perros con mayor grado de disfunción cognitiva. Los elevados niveles de  $K^+$  en LCR implicarían que éste no se está introduciendo en las neuronas, posiblemente asociado a un fallo en la bomba  $Na^+-K^+-ATPasa$ , dependiente de energía. La alteración del metabolismo oxidativo en el Alzheimer y en el SDCC justifica la falta de energía en forma de ATP para el correcto funcionamiento de la bomba  $Na^+-K^+-ATPasa$  y el consiguiente aumento de  $K^+$  extracelular.

El  $Ca^{+2}$  es un electrolito que interviene en numerosas funciones intra y extracelulares. El  $Ca^{+2}$  es sumamente importante en la sinapsis neuromuscular, ya que es el encargado de entrar en el terminal presináptico para permitir la unión de la vesícula sináptica a la membrana y la liberación de acetilcolina. Además, actúa estabilizando las membranas neuronales al disminuir su permeabilidad al  $Na^+$  (Di Bartola 2012). Existen 3 formas diferentes de  $Ca^{+2}$ : el  $Ca^{+2}$  ionizado o  $Ca^{+2}$  libre (que es el biológicamente activo), el  $Ca^{+2}$  unido a proteínas y el  $Ca^{+2}$  unido a otros solutos como lactato, fosfato, bicarbonato, citrato y oxalato. El  $Ca^{+2}$  habitualmente medido en la práctica clínica es el  $Ca^{+2}$  total, la suma de los 3 tipos de  $Ca^{+2}$  circulante que existen. No obstante, solo el  $Ca^{+2}$  iónico es el que puede ser empleado por las células para sus distintas funciones, por lo que debe ser el que empleemos para diagnosticar una condición patológica (Silverstein y Hopper 2015).

En medicina veterinaria no se ha establecido aún el rango fisiológico de  $Ca^{+2}$  total e iónico por la falta de estudios, mientras que en medicina humana aún se siguen haciendo estudios para esclarecerlos. Miyamoto y col. (2004) obtienen valores de  $Ca^{+2}$  iónico en LCR en niños de 1,07 mM/L en el grupo control sano y 1,03 mM/L en el grupo con crisis convulsivas. Forsberg y col. (2019) obtienen en su estudio muestras de LCR de 21 voluntarios sanos, estableciendo valores de  $Ca^{+2}$  total en LCR de 1,18 mM/L y de  $Ca^{+2}$  iónico de 1 mM/L. A conocimiento del autor, no existen estudios que establezcan valores de referencia del  $Ca^{+2}$  iónico en LCR en el perro. Sí hay estudios que determinan valores de  $Ca^{+2}$  total. Pugliese y col. (2005) obtienen valores de  $Ca^{+2}$  total de 1,36 mM/L en el grupo control. Di Terlizzi y Platt (2006), en su revisión sobre LCR, describen valores de  $Ca^{+2}$  total en LCR de 1-1,5 mmol/L, mientras que en plasma el rango es más alto (2-2,75mmol/L). Witsberger y col. (2012) miden  $Ca^{+2}$  total en CL, obteniendo resultados de 1,25mM/L.

La concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en LCR es independiente de la del plasma. El  $\text{Ca}^{+2}$  entra en LCR por transporte activo a nivel de la BHE, concretamente en los plexos coroideos y endotelio cerebrovascular, por lo que las variaciones bruscas en sangre van a tener poco efecto en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  en LCR (Di Terlizzi y Platt 2006). Tanto la BHE como la barrera sangre-LCR regulan el transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  dentro del SNC. En concreto, el epitelio del plexo coroideo es la principal ruta de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  (Damkier y col 2013). Aunque no se conoce con exactitud todo el mecanismo de transporte del  $\text{Ca}^{+2}$ , la teoría más aceptada es la recogida en el artículo de Damkier y col (2013). El  $\text{Ca}^{+2}$  utilizaría canales iónicos en la membrana basolateral de la BHE para pasar de la sangre al espacio intracelular. Aquí se uniría a proteínas citoplasmáticas para llegar hasta la membrana luminal, desde donde saldría al LCR mediante intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  o mediante la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa. Trabajos como el de Gazda y col. (2017) estudian las alteraciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  en relación con la aparición de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Encuentran que la proteína precursora de amiloide está relacionada con la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  a nivel del retículo endoplásmico en las neuronas. Células con concentraciones anormalmente altas de  $\text{Ca}^{+2}$  en retículo endoplásmico también presentaban mayores cantidades de proteína amiloide.

El  $\text{Cl}^-$  junto con el  $\text{HCO}_3^-$  son los dos aniones más importantes en plasma y LCR. El  $\text{Cl}^-$ , a diferencia de los electrolitos anteriores, no juega un papel importante en la sinapsis ni en la transmisión del impulso nervioso. El  $\text{Cl}^-$  es especialmente importante en el mantenimiento de la osmolaridad y la regulación del estado ácido-base. La concentración de  $\text{Cl}^-$  en LCR es ligeramente superior a la del plasma y la concentración intracelular es netamente inferior a ambas (Di Bartola 2012). El transporte de  $\text{Cl}^-$  dentro del SNC está ligado al transporte de  $\text{HCO}_3^-$ , ya que la única ruta conocida para el paso de  $\text{Cl}^-$  de la sangre a las células es mediante intercambio con  $\text{HCO}_3^-$  a través de un transportador específico de membrana llamado AE2. Parte del  $\text{Cl}^-$  volverá a la sangre por el anteriormente descrito KCC3. La salida de  $\text{Cl}^-$  a LCR se va a producir en las células epiteliales del plexo coroideo mediante cotransporte con  $\text{K}^+$  y de manera pasiva por canales aniónicos (Damkier y col. 2013, Hladky y Barrand 2016). Akaishi y col. (2018) evalúan los niveles de  $\text{Cl}^-$  en LCR en pacientes con neuromielitis óptica (NMO) que desarrollan alteraciones visuales. La NMO es una enfermedad neurológica inmunomediada con alta incidencia de recidivas. La extensión de la neuritis óptica y el grado de pérdida de visión han sido relacionados, pero Akaishi y col. (2018) tratan de

establecer la relación entre los niveles de  $\text{Cl}^-$  y el pronóstico visual. Encuentran una fuerte relación entre los niveles de  $\text{Cl}^-$  en LCR y la extensión de la neuritis en la fase aguda de la enfermedad.

---

#### 3.2.4.7 Balance ácido-base

---

El mantenimiento del estado ácido-base (A-B) resulta esencial para el buen funcionamiento celular. Las alteraciones en el equilibrio A-B en el SNC van a provocar cambios electroquímicos en las membranas neuronales, afectando a la conducción nerviosa. Una acidosis severa puede provocar un estado mental deprimido, comatoso o incluso la muerte. La alcalinización excesiva del LCR puede provocar convulsiones severas (Christensen y col. 2018). El valor numérico que le damos al estado A-B viene determinado por el pH, que es el  $-\text{Log} [\text{H}^+]$ . Esta ecuación implica que pequeñas variaciones en la concentración de hidrogeniones se traducen en grandes variaciones del pH, por lo que el organismo debe presentar mecanismos compensatorios para regular las variaciones del pH de forma rápida (Silverstein y Hopper 2015). Los valores de pH pueden oscilar entre 0 y 14, pero los mamíferos tienen un estrecho rango fisiológico de 7,36-7,42. Numerosas patologías (diabetes, cetoacidosis diabética, dilatación-torsión gástrica, enfermedad renal, traumatismo craneoencefálico, entre otras) pueden alterar este escaso margen de pH tanto en sangre como en LCR. Por lo tanto, el organismo inicia mecanismos compensatorios tanto respiratorios como metabólicos y sistemas tampón para tratar de normalizarlo (Nattie y Edwards 1981).

Para entender el equilibrio A-B es necesario conocer algunos conceptos. Cuando el pH sanguíneo desciende por debajo de su rango fisiológico inferior, se dice que presenta acidemia. Lo mismo ocurre cuando el pH está por encima del rango fisiológico, denominado alcalemia. Los mecanismos que generan ese descenso o aumento del PH sanguíneo se denominan acidosis o alcalosis, respectivamente. Cuando se produce una acidosis metabólica por cúmulo de ácidos (ácido láctico, ácido úrico, cetoácidos) en el organismo, éste debe responder con una alkalosis respiratoria, eliminando  $\text{CO}_2$ , para compensar el desequilibrio. De la misma manera, cuando se produce alcalosis metabólica, el cuerpo responde acumulando ácidos volátiles como el  $\text{CO}_2$  hipoventilando (acidosis respiratoria compensatoria). Cuando el problema primario

se instaura en el compartimento respiratorio, es decir, cuando no se produce un buen intercambio alveolar, el mecanismo compensatorio lo inicia el compartimento metabólico a nivel renal. En la acidosis respiratoria (cúmulo de  $\text{CO}_2$ ) el riñón debe responder reteniendo bases ( $\text{HCO}_3^-$ ) pero la respuesta metabólica es siempre mucho más lenta que la respiratoria, tardando hasta 2 y 3 días en compensar el problema. En la alcalosis respiratoria, el riñón debe responder reteniendo ácidos (hidrogeniones  $\text{H}^+$ ) (Di Bartola 2012, Silverstein y Hopper 2015).

Kazemi y Johnson (1986) llevaron a cabo una extensa revisión sobre la composición del LCR en medicina humana. En un estudio llevado a cabo en perros anestesiados, observaron que tras la inoculación de una solución ácida en el sistema ventricular, aumentaba la frecuencia respiratoria de modo compensatorio. Al perfundir una sustancia alcalina ocurría lo contrario. Esto llevó a pensar en la existencia de receptores sensibles a la concentración de hidrogeniones a nivel del SNC. Estos receptores han sido encontrados en la zona ventrolateral de la médula oblongada y en diversos núcleos del tronco del encéfalo, pero no está clara su localización (Damkier y col. 2013). La concentración de  $\text{H}^+$  en espacio extracelular es muy baja con respecto a los demás electrolitos estudiados y ayuda a mantener un pH entre 7,36-7,42. Este pH se puede mantener gracias al control que ejerce el encéfalo sobre los niveles de  $\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$  (Hladky y Barrand 2016). La concentración de  $\text{CO}_2$  en LCR y fluido intersticial va a depender del ratio de producción por el parénquima encefálico (como resultado de la oxidación de la glucosa) y de la velocidad a la que el  $\text{CO}_2$  formado es retirado por la sangre (Kazemi y Johnson 1986). El  $\text{CO}_2$  pasará a la sangre por difusión pasiva a través de las membranas celulares o uniéndose a moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  para formar ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que será excretado de la células por transporte activo y de nuevo disociado a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}^+$  en espacio extracelular. El  $\text{HCO}_3^-$  difunde fuera de las células por transportadores específicos o de la misma manera que el  $\text{CO}_2$ , formando  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (Hladky y Barrand 2016).

Cuando los niveles de  $\text{CO}_2$  aumentan en sangre arterial, éste difunde rápidamente al parénquima encefálico y al LCR. La BHE y la barrera sangre-LCR son relativamente impermeables al  $\text{H}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$ , pero no al  $\text{CO}_2$ . Al aumentar el  $\text{CO}_2$  en LCR se activan los quimiorreceptores que van a regular la ventilación (Damkier y col. 2013). Para contrarrestar la acidificación que esto provoca, la célula de glía o del plexo coroideo capta el  $\text{CO}_2$  y gracias a la acción de la anhidrasa carbónica lo convierte en  $\text{H}^+$

y  $\text{HCO}_3^-$  (Kazemi y Choma 1977). Parte de ese  $\text{HCO}_3^-$  saldrá de la célula a espacio intersticial para contrarrestar el exceso de  $\text{CO}_2$ . Este mecanismo tamponador protege a las neuronas y astrocitos de los cambios bruscos de pH pero solo de forma limitada, ya que la célula no puede mantener la formación de  $\text{HCO}_3^-$  si sigue estando el  $\text{CO}_2$  arterial elevado (Hladky y Barrand 2016). La capacidad del LCR para compensar el pH en acidosis respiratoria es mucho mayor que la de la sangre debido a la gran concentración de  $\text{HCO}_3^-$  (Kazemi y Choma 1977). La barrera sangre-LCR, a nivel de las células del plexo coroideo, es la principal responsable de estos mecanismos compensatorios. El  $\text{HCO}_3^-$  necesario para tamponar el exceso de  $\text{CO}_2$  se adquiere por dos vías, siendo transportado desde la misma barrera sangre-LCR o por síntesis en las células del plexo coroideo para su posterior liberación al LCR (Christensen y col. 2018).

Para estudiar los mecanismos compensatorios del encéfalo ante un estado de alcalosis respiratoria, Kazemi y col. (1969) midieron los niveles de lactato y piruvato en encéfalo, LCR y sangre arterial en perros sometidos a hipocapnia por ventilación mecánica. Durante la alcalosis respiratoria se produce hiperventilación y disminución de los niveles de  $\text{CO}_2$  en sangre. Esta hipocapnia va a provocar vasoconstricción a nivel cerebral y la correspondiente disminución en el flujo sanguíneo cerebral. Al disminuir el aporte de oxígeno al parénquima encefálico, éste activa la vía glucolítica anaeróbica, produciendo lactato como metabolito final. De manera compensatoria, y ante la reducción en el aporte de  $\text{CO}_2$ , las células del plexo coroideo van a reducir la actividad de la anhidrasa carbónica y van a producir menos  $\text{HCO}_3^-$ . Por lo tanto, la alcalinización del pH del LCR va a compensarse con el aumento de la producción de ácidos en forma de lactato y con la reducción de la formación de bases ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Kazemi y col. 1969).

En el estudio descrito por Sugi y col. (1975) inducen hematoma intracerebral o hemorragia subaracnoidea de forma experimental en 20 perros. La instauración de un metabolismo anaerobio, como consecuencia de la disminución del flujo sanguíneo cerebral provoca la glicolisis anaerobia y la liberación masiva de lactato a espacio extracelular. El lactato, uno de los principales ácidos presentes en el organismo, contribuye a una acidificación del pH en LCR y una disminución del  $\text{HCO}_3^-$  de forma compensatoria. Los autores concluyeron que el lactato y el ratio lactato/piruvato son biomarcadores útiles de hipoxia encefálica.

---

### 3.3 ANESTESIA

---

Como se puede observar en capítulos anteriores, existen numerosos estudios en medicina humana sobre el MEC. Sin embargo, en medicina veterinaria, los estudios son más limitados. Pugliese y col. (2005) realizan mediciones de lactato y piruvato en perros con SDCC, extrapolando los resultados con la enfermedad de Alzheimer en personas. Kiewert y col. (2010), en un modelo experimental de accidente cerebrovascular, emplean ratones de laboratorio a los que se les provoca isquemia cerebral para evaluar los cambios metabólicos en el encéfalo hipóxico. Muchos de los estudios que se llevan a cabo en animales son realizados por médicos, anatomopatólogos o empresas farmacéuticas, tomando animales de experimentación como modelos de diferentes patologías humanas. La falta de estudios en animales de compañía, haciendo especial referencia al perro, hace que en la profesión veterinaria carezcamos de consensos universales y reglados de los diferentes biomarcadores medidos en LCR y su relación con enfermedades. Además, en veterinaria, la extracción del LCR debe hacerse bajo anestesia general, condicionando aún más la homogeneidad de los estudios. Caines y col. (2012) evalúan la concentración de lactato en LCR en perros anestesiados con y sin enfermedad intracraneal. Para ello emplean diferentes fármacos anestésicos, tales como acepromacina, hidromorfona, propofol, tiopental, isoflurano, atracurio, entre otros. Esto hace que se aumente enormemente el sesgo de los datos por las diferentes implicaciones que pueden tener en el MEC cada uno de los fármacos utilizados.

Los agentes anestésicos han demostrado influir en mayor o menor medida en la medición de biomarcadores del MEC en el LCR. Kiewert y col. (2010) detectan niveles significativamente altos de lactato en LCR pero no pueden descartar que esa elevación sea como consecuencias del empleo de gases anestésicos. Horn y Klein (2010) estudian el efecto de diferentes agentes anestésicos en los niveles de lactato y glucosa en sangre, líquido extracelular y LCR mediante un estudio de microdiálisis en ratones. En dicho estudio se observó que el isoflurano, sevoflurano y halotano provocaron grandes aumentos dosis-dependientes en el lactato. En menor medida, también se observaron aumentos en la concentración de piruvato en líquido extracelular de las regiones del hipocampo y del cuerpo estriado. El lactato también aumentó, aunque en menor medida, en sangre y LCR. La ketamina, xilacina e hidrato de cloral provocaron una elevación

mínima del lactato en sangre y LCR. El pentobarbital fue el único agente anestésico que no provocó ningún cambio.

---

### 3.3.1 Propofol

---

El propofol es un anestésico intravenoso alquifenólico. Se desarrolló en Reino Unido en la década de 1970 y pronto comenzó a utilizarse como hipnótico en todo el mundo. El propofol está formulado en una emulsión lipídica debido a la alta liposolubilidad de los alquifenoles y su baja solubilidad en agua. Todas las presentaciones comerciales que existen presentan un color blanco y aspecto ligeramente viscoso, tiene un pH de 7 y no es sensible a la luz. El propofol es estable a temperatura ambiente, pero se recomienda mantenerlo a temperaturas por debajo de 22°C y por encima de 4°C (Sams y col. 2008, Miller 2015). La emulsión comercializada en veterinaria contiene 100mg/ml de aceite de soja, 22,5mg/ml de glicerol y 12mg/ml de lecitina de huevo purificada, además de EDTA como agente bacteriostático (Sams y col. 2008, Plumb 2011).

La farmacocinética explora los mecanismos del organismo para metabolizar y excretar un fármaco, así como la absorción y distribución en los tejidos. Tras la administración intravenosa de un bolo de propofol, éste atraviesa rápidamente la BHE, presentando acción hipnótica a los 30-60 segundos de la administración (Plumb 2011, Sahinovic y col. 2018). El propofol es metabolizado principalmente por el hígado mediante glucorono-conjugación en tres metabolitos inactivos. Su aclaramiento (volumen de plasma libre del fármaco por unidad de tiempo) es de 50ml/kg/min, superando significativamente el volumen de sangre por minuto que llega al hígado. Por lo tanto, existen otras vías metabólicas extrahepáticas para eliminar el fármaco de la sangre, como son la vía renal. El riñón es responsable de aproximadamente el 30% del aclaramiento del propofol. Además, el intestino delgado es también metabólicamente activo en la degradación del propofol, representando un 24% del ratio de extracción por vías extrahepáticas (Sahinovic y col. 2018). El 88% del propofol es eliminado en orina durante los 5 días siguientes a su inyección. Menos del 0,3% es eliminado sin metabolizar. La vía de eliminación pulmonar, aunque no retira de la sangre una cantidad

significativa de propofol, también está presente en su farmacocinética (Sahinovic y col. 2018).

La distribución de un fármaco en el organismo va a depender de su grado de unión a proteínas y del flujo de sangre a los tejidos entre otros factores. El propofol presenta una alta tasa de unión a proteínas (95-99%) por lo que en pacientes hipoalbuminémicos, la fracción libre o activa del fármaco será mucho mayor, aumentando los posibles efectos adversos del mismo (Sahinovic y col. 2018). La vida media de distribución del propofol es de 1-8 minutos, lo que significa que el 50% del fármaco se va a distribuir por los tejidos en ese tiempo. La vida media de eliminación es de 1,4 horas. El propofol provoca hipotensión, bradicardia y es inotropo negativo, por lo que disminuye en cierto modo el aporte de sangre al hígado y al riñón. Una sobredosificación con propofol no solo va a provocar efectos adversos mayores en los primeros 8 minutos, sino que, al disminuir su metabolismo y excreción, su efecto hipnótico puede perdurar varias horas. Del mismo modo, todo aquello que provoque un aumento del gasto cardíaco y del aporte de sangre al hígado, va a provocar una disminución más rápida de la concentración de fármaco libre en sangre (Plumb 2011, Miller 2015).

La farmacodinamia explica los efectos que produce un determinado principio activo en el organismo. El propofol es un agonista del neurotransmisor inhibitorio ácido gamma aminobutírico (GABA). A nivel del SNC, el propofol se une a la subunidad  $\beta$  del receptor postsináptico del GABA provocando la entrada masiva de  $\text{Cl}^-$  al interior de la célula. De esta manera aumenta la carga negativa en la cara citosólica de la membrana postsináptica y se produce la hiperpolarización y consecuente inhibición de la despolarización neuronal (Miller 2015). Los receptores gabaérgicos se encuentran distribuidos de forma difusa por todo el SNC. Cuando el efecto del propofol ocurre en neuronas de la formación reticular del tronco del encéfalo y del tálamo, desencadena efectos hipnóticos. En la formación reticular se encuentra el sistema activador reticular ascendente (SARA), responsable de la activación de centros superiores de la corteza y del estado vigilia/sueño. El tálamo, por su parte, desempeña un papel fundamental en el procesado de la información. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el que el propofol genera efectos hipnóticos, ésta es la teoría más aceptada globalmente (Sahinovic y col. 2018). A dosis subanestésicas, el propofol provoca sedación y ansiolisis. Además, el propofol disminuye el ratio metabólico cerebral, disminuye el

flujo de sangre cerebral y la presión intracraneal, por lo que se usa ampliamente en un tratamiento neuroprotector multimodal. El propofol presenta efectos tanto anticonvulsivos como proconvulsivos. El efecto anticonvulsivo se produce por su acción sinérgica con el GABA, la inhibición de receptores NMDA y la modulación de los receptores del  $Ca^{+2}$ . Sin embargo, el efecto de antagonismo sobre la glicina puede provocar crisis epileptiformes como mioclonias, temores o incluso crisis tónico-clónicas generalizadas en el periodo de inducción o recuperación anestésica (Miller 2015).

En medicina humana se ha demostrado que puede provocar amnesia dosis-dependiente, efecto antiemético y existe controversia acerca del efecto analgésico del propofol. El estudio de revisión de Sahinovic y col. (2018) incluye estudios a favor y en contra de este efecto analgésico. Nadeson y Goodchild (1997) llevaron a cabo un estudio en ratas a las que se les inocula propofol intraperitoneal, empleando test de conducción eléctrica como estímulos dolorosos. Concluyen que el propofol actúa a nivel de los receptores GABA de los segmentos caudales de la médula espinal, disminuyendo la excitabilidad neuronal y la transmisión de impulsos dolorosos al encéfalo. Por otro lado, Peng y col. (2016) llevan a cabo un meta-análisis en 4520 pacientes comparando el efecto analgésico del propofol con anestésicos inhalatorios sin encontrar diferencias significativas en el dolor postoperatorio.

A nivel cardiovascular, en medicina humana, el principal efecto del propofol es una reducción de la presión arterial y del gasto cardíaco, mediado por un descenso del tono simpático y de la resistencia vascular (Miller 2015). En medicina veterinaria los efectos cardiovasculares son parecidos. Cattai y col. (2018) llevan a cabo un estudio en 8 perros para cuantificar los cambios hemodinámicos que provoca el propofol durante la inducción anestésica. En los pacientes estudiados, observan un descenso de las presiones arteriales tras el bolo de propofol, inoculado en 30 segundos. Esta hipotensión transitoria puede deberse a varios factores. Por un lado, el propofol provoca una reducción de la resistencia vascular sistémica, venodilatación y disminución de la precarga. Además, provoca efecto inotropeo negativo disminuyendo también la postcarga, reduciendo así el gasto cardíaco. El propofol provoca una depresión del sistema nervioso simpático a nivel del SNC (Bustamante y col. 2018). Cattai y col. (2018) observan que el gasto cardíaco se mantiene a pesar de la hipotensión generada, por lo que existe una respuesta cronotropa compensatoria efectiva en el perro. La

hipotensión es un efecto dosis-dependiente, y aunque puede ocurrir incluso a dosis sedantes, el efecto es más evidente en pacientes geriátricos o con patologías graves (Plumb 2011). Bustamante y col. (2018) llevan a cabo un estudio en perros sometidos a cirugía de cadera. Comparan el efecto del mantenimiento anestésico con isoflurano o anestesia total intravenosa (TIVA) con propofol en las presiones arteriales y en la ventilación. Concluyen que la TIVA de propofol presentó presiones arteriales medias (PAM) superiores al grupo de perros mantenidos con anestesia inhalatoria. El grupo de la TIVA presentó, sin embargo, mayores complicaciones asociadas a hipoventilación y requirieron ventilación mecánica en mayor medida. En medicina humana, a dosis por encima del rango de acción, el propofol puede tener efecto inotrope negativo al disminuir la recaptación de  $Ca^{+2}$  en el retículo sarcoplásmico (Miller 2015). En medicina veterinaria, ese efecto inotrope negativo presenta una repuesta cronotropa positiva compensatoria. No obstante, el efecto inotrope negativo puede exacerbarse con el uso de opiáceos en la premedicación o con sobredosificación en pacientes en estado de shock (Cattai y col. 2018).

A nivel del sistema respiratorio, el propofol reduce la sensibilidad de los quimiorreceptores al  $CO_2$  y al  $O_2$ , provocando hipoventilación dosis-dependiente (Bustamante y col. 2018). La depresión respiratoria y la apnea son los efectos adversos más frecuentes derivados del uso de propofol (Sams y col. 2008). En sobredosificación o inoculación muy rápida se puede producir apnea. A nivel de vías respiratorias altas provoca relajación de la musculatura y supresión de reflejos respiratorios (Miller 2015).

Entre los usos más frecuentes del propofol en la práctica clínica están el empleo como agente inductor en anestesia, previo a la intubación endotraqueal. Además, es utilizado con frecuencia como anestésico en procedimientos diagnósticos (radiografías, ecografías, endoscopias) y tratamiento básico de heridas. En la unidad de cuidados intensivos puede ser empleado como sedante en infusión continua o como anticonvulsivo en el tratamiento del *status epilepticus*. Es un fármaco seguro en pacientes con enfermedad renal, hepática y en cardiopatías leves. Sin embargo, el propofol aumenta la sensibilidad del sistema cardiorrespiratorio a los efectos adversos hipotensores y de hipoventilación en situación de estrés sistémico, por lo que en pacientes en estado de shock es necesario ajustar y monitorizar la dosis de propofol para evitar la sobreexpresión de efectos secundarios. Se debe emplear también con mucha cautela en pacientes hipoalbuminémicos dada su elevada tasa de unión a proteínas

(95%-99%). En un paciente hipoproteinémico, la fracción libre de fármaco será mayor, por lo que hay que ajustar la dosis para evitar los efectos secundarios. Su uso está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad al propofol o a cualquiera de sus componentes (Plumb 2011).

---

### 3.3.2 Isoflurano

---

El isoflurano es un agente anestésico inhalatorio. Es un compuesto orgánico halogenado y no inflamable. En la década de 1960, Eger y col. definen por primera vez la concentración alveolar mínima (CAM) como la concentración atmosférica del anestésico inhalatorio necesaria para prevenir el movimiento de un paciente ante un estímulo doloroso en el 50% de los casos. A raíz de este estudio, la anestesia inhalatoria evolucionó hasta lo que hoy conocemos, manteniendo en esencia la definición de CAM (Miller 2015). La presentación comercial del isoflurano es un líquido transparente, de olor fuerte y estable a temperatura ambiente. Debe ser conservado en recipientes con paredes pigmentadas para preservarlo de la luz directa, aunque es relativamente resistente a la exposición lumínica. Para su uso, es necesaria la utilización de un vaporizador de isoflurano para transformarlo del estado líquido al gaseoso (su punto de ebullición oscila de los 50-59°C) y poder ser utilizado por la máquina anestésica (Plumb 2011).

El isoflurano es rápidamente absorbido por el alveolo. La cantidad de fármaco libre en sangre con efecto anestésico va a depender del coeficiente de partición sangre/gas (1,4 en el caso del isoflurano). Este coeficiente mide la cantidad de fármaco disuelto en sangre y determina la velocidad a la que ocurren los cambios en el plano anestésico. A mayor coeficiente, mayor será la solubilidad y más lentos serán los cambios (Miller 2015). Además de la solubilidad del isoflurano, la cantidad de fármaco que pasa a sangre va a depender de la capacidad ventilatoria del alveolo, que a su vez se relaciona con la frecuencia y profundidad de las ventilaciones. Una adecuada perfusión pulmonar va a ser esencial para la correcta difusión del isoflurano del alveolo a la sangre. Por otro lado, el efecto anestésico del isoflurano va a depender de su solubilidad en los tejidos, la perfusión de esos tejidos y el gradiente de concentración

entre la sangre y el tejido (Dugdale 2010). La gran mayoría del isofluorano va a ser eliminada por los pulmones, solo el 0,17% presenta metabolismo hepático (Plumb 2011).

Todos los agentes anestésicos volátiles van a causar depresión cardiovascular dosis-dependiente, reduciendo la presión arterial y el gasto cardíaco (Bustamante y col. 2018). El isofluorano causa ligero efecto inotrope negativo, vasodilatación periférica y es simpaticolítico, disminuyendo considerablemente el tono vascular. Este agente actúa como bloqueante de los canales de  $Ca^{+2}$  tanto a nivel de la musculatura estriada cardíaca, como vascular y musculatura apendicular. Por lo tanto, provoca vasodilatación y depresión cardíaca limitando la capacidad contráctil de la musculatura. De forma refleja puede aparecer una ligera taquicardia compensatoria a la hipotensión (Dugdale 2010). A pesar del efecto cardiovascular del isofluorano, en medicina humana se describe un efecto cardioprotector de los anestésicos volátiles en general y del isofluorano en particular. Este efecto cardiovascular presenta vías metabólicas muy similares al efecto de preconditionamiento celular. Este efecto consiste en someter a periodos cortos de isquemia-reperfusión a un determinado tejido del organismo, con el objetivo de protegerlo frente a una isquemia prolongada posterior. El preconditionamiento celular es utilizado principalmente en cirugías cardíacas y renales con resultados todavía en debate. El isofluorano, mediante vías metabólicas semejantes, provoca la reducción del  $Ca^{+2}$  mitocondrial y citosólico, protegiendo a las células cardíacas de la sobrecarga de  $Ca^{+2}$  durante un proceso isquémico de cualquier índole (LaMonaca y Fodale 2012).

A nivel respiratorio, el isofluorano puede causar ligera hipoventilación, y en consecuencia, acidosis si no se contrarresta con ventilación mecánica (Dugdale 2010). A nivel cerebral, provoca la reducción del ratio metabólico encefálico. Al reducir la demanda de energía, en condiciones normales el encéfalo responde reduciendo el flujo de sangre, pero en la anestesia con isofluorano ese mecanismo compensatorio está abolido. De esta manera, aunque el ratio metabólico disminuya, la vasodilatación periférica generada por dicho agente va a provocar un mayor flujo de sangre cerebral y el aumento de la PIC (Miller 2015).

Bustamante y col. (2018) comparan los efectos clínicos del mantenimiento anestésico con isofluorano o TIVA de propofol. Para su estudio emplean perros

sometidos a cirugía ortopédica de extremidades posteriores. En el protocolo anestésico emplean dexmedetomidina y metadona como premedicación, propofol como inductor y anestesia epidural (bupivacaína y morfina). Para el mantenimiento anestésico emplean dos protocolos, un grupo de pacientes se mantuvo con isoflurano y el otro con TIVA de propofol. Los autores concluyen que la TIVA de propofol mantuvo mejor la PAM durante toda la anestesia. No obstante, fue necesario el empleo de ventilación mecánica por la mayor depresión respiratoria generada por el propofol.

El isoflurano debe ser empleado con cautela en pacientes con posible aumento de la PIC (dado que el isoflurano aumenta el flujo sanguíneo cerebral) y pacientes con *miastenia gravis* (debido a la relajación muscular que induce). Su uso está contraindicado en pacientes con antecedentes de hipertermia maligna, un defecto genético en la regulación del  $\text{Ca}^{+2}$  a nivel de las células musculares que provoca un metabolismo exacerbado. Los anestésicos volátiles como el isoflurano, desflurano o halotano son fármacos que desencadenan esta enfermedad durante la anestesia. Estos agentes anestésicos van a provocar la salida masiva de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarcoplásmico y la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a las células musculares. El exceso de  $\text{Ca}^{+2}$  va a provocar la contracción de la musculatura esquelética y la activación de la glucogenolisis, aumentando el metabolismo celular. En consecuencia, aumenta la producción de calor, lactato y  $\text{CO}_2$  (Rosenberg y col. 2003).

---

### 3.3.3 Influencia de los anestésicos en el metabolismo energético cerebral

---

La mitocondria es el principal orgánulo implicado en el metabolismo celular. La mitocondria produce la energía suficiente para el funcionamiento celular y la homeostasis mediante fosforilación oxidativa, una reacción metabólica llevada a cabo en la membrana interna mitocondrial (Muravchick y Levy 2006). Esta ruta metabólica genera un ineludible estrés oxidativo en todas las células, en especial aquellas con gran cantidad de mitocondrias como las neuronas y astrocitos. La fosforilación oxidativa va a generar la creación de RL por la interacción entre los electrones libres y el  $\text{O}_2$ . Los RL formados, como los peróxidos, superóxidos y radicales hidroxilo, pueden dañar o destruir las membranas celulares, los complejos enzimáticos mitocondriales y en

general toda la citoarquitectura. Al alterarse la fluidez de las membranas, se verá afectada su correcta funcionalidad (Muravchick y Levy 2006).

Diferentes estudios (Plumb 2011, Miller 2015, Bustamante y col. 2018) han demostrado que los agentes anestésicos pueden disminuir la demanda energética del encéfalo al reducir el metabolismo de carbohidratos y el consumo de O<sub>2</sub>. El propofol disminuye el consumo de O<sub>2</sub> y la producción de ATP en los terminales sinápticos y reduce el transporte de electrones en las mitocondrias de las células cardíacas. Inhibe el complejo 1 de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la ATP-asa. Los anestésicos inhalatorios presentan los mismos efectos depresores sobre la respiración mitocondrial inhibiendo el complejo 1 (Muravchick y Levy 2006). Además, los pacientes con defectos mitocondriales hereditarios o adquiridos presentan una mayor sensibilidad a los agentes anestésicos, especialmente inhalatorios, como consecuencia de un déficit bioenergético preexistente en la mitocondria (Kayser y col. 2004).

En el encéfalo, las neuronas presentan mecanismos de protección frente a los RL. Algunos de estos mecanismos de protección son la activación de una mayor velocidad de reparación del ADN mitocondrial, el aumento en la producción de proteínas inhibitoras de la apoptosis, la mayor generación de factores neurotróficos y la movilización de células madre para reponer las neuronas dañadas. Sin embargo, cuando el daño oxidativo es muy grande (traumatismo craneoencefálico) o muy crónico (Parkinson, Alzheimer), esta capacidad de compensación se ve superada y aparecen las secuelas neurológicas (Muravchick y Levy 2006). En el estudio llevado a cabo por Wei y col. (2005) exponen que las alteraciones genéticas que predisponen a padecer Alzheimer también hacen más sensibles a las neuronas a la excitotoxicidad generada por los anestésicos inhalatorios y también más sensibles a la apoptosis. El isoflurano provoca citotoxicidad en neuronas corticales generando la salida masiva de Ca<sup>+2</sup> del retículo endoplásmico hacia el citoplasma, desencadenando en la apoptosis de las neuronas más dañadas (Wei y col. 2005).

Nicholatos y col. (2019) realizan un interesante estudio sobre el metabolismo celular y el desacople mitocondrial (DM) en perros. Utilizan fibroblastos para estudiar las propiedades mitocondriales en dos grupos de perros bien diferenciados, perros de razas grandes y esperanza de vida media de 7 años, y perros de razas pequeñas y esperanza de vida media de 16 años. Nicholatos y col. (2019) muestran en su estudio

que las células de los perros de vida media larga presentan mayor DM, menor pérdida de electrones de la cadena de respiración mitocondrial y, por lo tanto, mejor capacidad respiratoria y menor producción de RL.

La cadena de transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial consume O<sub>2</sub> para generar un potencial electroquímico usado por la ATP-sintetasa para generar energía en forma de ATP (Demine y col. 2019). Demine y col. (2019) llevan a cabo un estudio de revisión sobre los complejos mecanismos citológicos del DM. Cuando la mitocondria no usa todo el potencial electroquímico para generar ATP y lo destina a otras funciones (como generar calor) se produce el DM. Este mecanismo es desencadenado por desacopladores mitocondriales como las proteínas de desacople (UCPs por sus siglas en inglés *Uncoupling Proteins*). Las UCPs son reguladas a su vez por desacopladores naturales o sintéticos. Las UCPs son una familia de proteínas que van a regular el intercambio de protones y electrones a través de la membrana interna mitocondrial, promoviendo el DM. Entre los desacopladores naturales (endógenos) más abundantes encontramos los ácidos grasos libres. Éstos van a estimular, por un lado, la respiración mitocondrial, y por otro, se piensa que pueden actuar como cofactor de las UCPs. Entre los desacopladores sintéticos, encontramos fármacos anestésicos como isoflurano, sevoflurano y halotano (Demine y col. 2019).

El DM puede entenderse como un mecanismo de protección de la mitocondria frente a una elevada producción de RL, asociado a una alta presencia de O<sub>2</sub> o un alto estrés oxidativo. No obstante, la reducción en la tasa de metabolismo oxidativo y, en consecuencia, la menor producción de ATP, debe ser compensada por la célula para poder seguir produciendo energía sin generar RL (Demine y col. 2019). Si no se activan los mecanismos compensatorios fisiológicos, o el DM es demasiado elevado como consecuencia de la sobreexposición a desacopladores sintéticos (fármacos), el DM puede promover la propia apoptosis. Demine y col. (2019) recogen una serie de estudios que relacionan alteraciones genéticas en la producción de UCPs con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Díaz-Maroto Cicuéndez y col. (2017) ponen de manifiesto la importancia del DM en enfermedades como la embolia cerebral en personas. Los pacientes que mostraban polimorfismo para el gen codificador de la UCP-2 (es decir, presentaban una mayor expresión de esta proteína en la membrana interna mitocondrial) presentaron mayor tasa de supervivencia a los 3 meses de la trombolisis. Esta mayor tasa de supervivencia la asocian al efecto neuroprotector

del DM al reducir la formación de RL en situaciones de estrés mitocondrial, como la hipoxia o la falta de nutrientes.

La exposición de las neuronas al efecto anestésico del isofluorano en personas ancianas ha sido propuesta como el principal desencadenante de la disfunción cognitiva post-operatoria (Li y col 2019). Zhang y col. (2010) llevan a cabo un estudio sobre el efecto del isofluorano en la inducción apoptótica mediada por el daño mitocondrial. Elaboran un estudio *in-vivo* e *in-vitro* en células de neuroglioma humanas y en neuronas de ratones de laboratorio a las que exponen a isofluorano al 2% durante 6 horas. La apoptosis es un complejo mecanismo celular que puede ser desencadenado por vías intrínsecas o extrínsecas. La vía intrínseca mitocondrial incluye el factor anti-apoptótico Bcl-2 y el factor pro-apoptótico Bax. La vía extrínseca incluye enzimas proteolíticas denominadas caspasas. Los autores encuentran en los dos tipos celulares estudiados que el isofluorano, al dañar la mitocondria, aumenta los niveles del factor Bax y disminuye los niveles del factor Bcl-2. El isofluorano provoca la liberación masiva de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo endoplásmico hacia el citosol. La mitocondria, mediante transportadores específicos de membrana, va a captar el  $\text{Ca}^{+2}$ . La sobrecarga de  $\text{Ca}^{+2}$  en el interior de la mitocondria colapsa el potencial de membrana mitocondrial, afectando a la cadena de transporte de electrones y aumentando la formación de RL. En este punto, la mitocondria dañada comienza a liberar citocromo-C como parte de la vía intrínseca de la apoptosis, que va a activar la cascada de caspasas induciendo la proteólisis mitocondrial y la apoptosis de la célula (Zhang y col. 2010). Los autores demuestran que las células tratadas con isofluorano presentan mayores niveles de citocromo-C en el citosol que las células del grupo control tratadas sólo con  $\text{O}_2$ . Concluyen que la exposición durante 6 horas al isofluorano inicia una cascada de reacciones pro-apoptóticas que incluye todas las vías mencionadas.

Li y col. (2019) realizan un estudio comparativo en ratas expuestas a isofluorano o isofluorano y lidocaína para evaluar el efecto neuroprotector del anestésico local en la disfunción cognitiva generada por el isofluorano. Todas las ratas son evaluadas mediante un test cognitivo a los 5 y 12 días tras la anestesia. El grupo anestesiado con isofluorano y lidocaína obtuvo mejores resultados en el test, cometiendo menos errores y hallando la solución en menos tiempo que el grupo anestesiado exclusivamente con isofluorano. Li y col. (2019) localizan alteraciones estructurales en las mitocondrias y vacuolización citoplasmática en neuronas hipocámpales de las ratas cognitivamente más

afectadas, reforzando los estudios de toxicidad mitocondrial del isofluorano. Por otro lado, detectan menor déficit cognitivo en las ratas tratadas adicionalmente con lidocaína. La lidocaína presenta efecto neuroprotector al reducir la liberación de excitotoxinas isquémicas. La lidocaína reduce el daño estructural de la mitocondria mediado por el isofluorano, estabiliza el potencial de membrana y la cadena de transporte de electrones e inhibe las vías apoptóticas mitocondriales (Li y col. 2019).

Berndt y col. (2018) investigan el efecto de la administración de propofol en el metabolismo neuronal. Para ello utilizan cortes histológicos de hipocampo de 44 ratones de laboratorio que someten a preparaciones con propofol. En cada corte miden la presión parcial de O<sub>2</sub>, estímulos electroencefalográficos y técnicas de imagen por fluorescencia. Concluyen que el propofol a dosis altas tiene un impacto directo sobre el metabolismo neuronal a dos niveles. Por un lado, el propofol disminuye la necesidad energética celular afectando a la sinapsis y a la cadena de transporte de electrones inhibiendo el complejo 1. Por otro lado, disminuye la disponibilidad del ATP inhibiendo el complejo 2 de la cadena respiratoria mitocondrial (Berndt y col. 2018). Además, el propofol provoca una incompleta oxidación de los ácidos grasos a nivel mitocondrial. Esto conlleva su acúmulo en el citoplasma y alteraciones en el transporte de Ca<sup>+2</sup>, bloqueando la transmisión de impulsos nerviosos, pudiendo generar arritmias cardíacas cuando se afectan las células miocárdicas (LaMonaca y Fodale 2012).

Cuando el propofol es empleado en infusión continua, el efecto que ejerce sobre el metabolismo mitocondrial puede ser la causa del llamado síndrome de infusión de propofol (SIP), descrito principalmente en medicina humana. El SIP es una complicación muy grave y poco frecuente que produce acidosis metabólica, rabiomolisis, arritmias (bradiarritmias, fibrilación atrial, taquicardia ventricular o supraventricular, bloqueo de rama, asistolia), fallo renal, mioglobulinuria, hiperkalemia, hepatomegalia, lipemia, y la muerte (LaMonaca y Fodale 2012, Mallard y col. 2018). Recientemente, Mallard y col. (2018) describen el primer caso documentado de SIP en un perro. En su estudio de casos atienden a un chihuahua hembra castrada de 8 años, referida por taquipnea, letargia, hiporexia y fiebre. En el protocolo diagnóstico detectan bronconeumonía en lóbulo caudal derecho. Dada la gravedad del paciente, debe ser mantenido con ventilación mecánica para asegurar una buena oxigenación de los tejidos, por lo que es sedada con propofol en infusión continua. 24 horas después de la sedación con propofol, comienza a desarrollar hipotensión, ritmo idioventricular

acelerado, hipoglucemia, pigmenturia, acidemia y metahemoglobinemia. Así mismo, presenta también un aumento exponencial de la CK muscular y de transaminasas hepáticas. Aunque no pueden concluir que se trate realmente de un SIP, el curso clínico del paciente se asemeja mucho al síndrome descrito en medicina humana (Mallard y col. 2018).

### 3.4 NUTRACÉUTICOS

---

Actualmente no existe una definición clara del término nutraceutico (NC) ni una regulación legal mundial de los productos que pueden ser comercializados con ese nombre. Stephen DeFelice, en 1989, definió los NCs como un alimento, o parte de un alimento, beneficioso para la salud, con efectos médicos en el tratamiento o prevención de una enfermedad (Daliu y col. 2018). Hoy en día, la falta de una definición clara al respecto crea confusión entre NC, suplementos nutricionales, hierbas medicinales, pre/probióticos y alimentos funcionales. Daliu y col. (2018) recogen en su estudio de revisión una posible definición de NC más cercana a la situación actual. Un NC es toda aquella sustancia constituida por un fitocomplejo (en el caso de que tenga origen vegetal) o grupo de metabolitos secundarios (en el caso de que tenga origen animal) elaborados de forma concentrada. En ambos casos, el NC debe poder ser administrado de manera sencilla y práctica, y debe presentar un efecto beneficioso para la salud respaldado por estudios clínicos.

Aronson (2017) recoge en su estudio las definiciones en varias regiones del mundo acerca de las diferentes clases de productos nutricionales disponibles. En Reino Unido, los NC son definidos como un tipo de alimento, aditivo o suplemento dietético que tiene efectos fisiológicos beneficiosos pero no son esenciales en la dieta. También son llamados como alimentos funcionales. En Estados Unidos elaboran una definición más amplia; un NC es un suplemento dietético, alimento o alimento medicalizado que por un lado, presenta beneficios previniendo o reduciendo el riesgo de padecimiento o empeoramiento de una enfermedad. Por otro lado, un NC debe ser además seguro para el consumo humano en la cantidad y frecuencia necesarias para alcanzar sus efectos beneficiosos. La Asociación Europea de Nutraceuticos los define como productos con efectos relevantes para la salud, no son ni sustancias sintéticas ni compuestos químicos y contienen nutrientes de forma concentrada. Los suplementos dietéticos o nutricionales son definidos como compuestos individuales usados en la terapia (lactasas en intolerantes a la lactosa) o prevención (glucosa en enfermedades de acúmulo de glucógeno) de determinadas enfermedades (Aronson 2017).

Las hierbas medicinales son definidas en Reino Unido como toda aquella planta cuyo tronco no es de madera, es más o menos suave, succulento, muere tras la

floración y alguna de sus partes presenta un uso médico. En la Unión Europea, los productos realizados con hierbas medicinales son aquellos productos medicinales compuestos exclusivamente de fragmentos de plantas, hongos, algas o líquenes frescos o desecados (Aronson 2017).

Los probióticos son definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como organismos vivos que, al ser administrados en cantidades suficientes, confieren un efecto beneficioso para la salud del hospedador. Los probióticos pueden ser bacterias o levaduras similares a las presentes de forma natural en el intestino. Los prebióticos son, por el contrario, un ingrediente alimenticio no digestible que estimula el crecimiento y/o la actividad de una o varias bacterias ya presentes en el intestino de forma natural (Lannitti y Palmieri 2010).

Dada la gran variabilidad de definiciones y legislaciones existentes en relación a los NCs o derivados, en esta tesis vamos a tomar como referencia la definición propuesta por Daliu y col. (2018). Un NC es “aquella sustancia constituida por un fitocomplejo o grupo de metabolitos secundarios elaborados de forma concentrada, son administrados de manera sencilla y práctica, y presentan un efecto beneficioso para la salud respaldado por estudios clínicos recientes”.

El uso de NCs en medicina humana se encuentra en auge en los últimos años. Prueba de ello son los numerosos artículos publicados recientemente acerca de las ventajas de determinados NCs en el tratamiento o prevención de patologías, siempre de forma coadyuvante a un tratamiento médico convencional. Gao y col. (2020) llevan a cabo una revisión sobre diferentes NCs utilizados en enfermedades gastrointestinales en personas. En el síndrome del intestino irritable se utiliza como NC a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente por sus efectos, demostrados científicamente, en la mejora del dolor abdominal e inflamación. Esta levadura mejora la sintomatología de dicho síndrome produciendo enzimas de degradación de los quelatos, produciendo ácidos grasos de cadena corta y mejorando la inmunidad gastrointestinal al destruir toxinas patológicas (Gao y col. 2020). Faheem y col. (2020) llevan a cabo un estudio en ratas para probar la eficacia de un NC a base de arándanos en la prevención de fibrosis hepática. La esteatosis hepática no-alcohólica es una enfermedad humana causada por el aumento patológico de los triglicéridos en el hepatocito. Cuando el hígado no puede hacer frente a la ingente cantidad de triglicéridos se produce fibrosis hepática, la cual

puede evolucionar a cirrosis y finalmente a carcinoma hepatocelular. Para su estudio, Faheem y col. (2020) emplean ratas sobrealimentadas con dieta grasa. Concluyen que el empleo de NCs a base de arándanos reduce la inflamación hepática y el estrés oxidativo en base a la reducción de IL-6 y FNT- $\alpha$ . Este NC disminuye también la esteatosis y mejora la sensibilidad a la insulina, optimizando el metabolismo celular.

En medicina veterinaria, el envejecimiento cerebral y el SDCC son áreas en donde los NCs han tomado mucha relevancia en los últimos años (Milgram y col. 2005, Pugliese y col. 2005, Head 2011, Landsberg y col. 2012). El tratamiento del SDCC se aborda desde tres ámbitos diferentes: desde el enriquecimiento ambiental y estímulo mental, desde el uso de fármacos y desde la terapia nutricional con dietas ricas en antioxidantes, ácidos grasos esenciales y NCs (Landsberg y col. 2012). Existen diversos NCs comerciales específicamente diseñados para animales como el Senilife® (Ceva Animal Health), Novifit® (Virbac), Neutricks® o Aktivait®. El Aktivait® es un NC comercializado por Vet Plus Ltd, Lytham St. Annes, UK, cuyo empleo como adyuvante de la terapia del SDCC ha sido probado con éxito en diferentes ensayos clínicos (Heath y col. 2007, Landsberg y col. 2012). Heath y col. (2007) prueban el producto en 20 perros con signos de SDCC. Llevan a cabo el tratamiento durante 56 días, durante los cuales, el estado cognitivo de los pacientes es evaluado mediante encuestas. Los autores encuentran diferencias significativas en las puntuaciones de las encuestas en los ítems de orientación y conducta de micción y defecación en casa a los días 21, 28 y 42 del tratamiento.

El Aktivait® es un NC compuesto por antioxidantes, vitaminas C y E, selenio, quelantes de RL (N-acetil cisteína (NAC)), ácido  $\alpha$ -lipoico, ácido docosahexanoico (DHA), ácido eicosapentanoico (EPA), L-carnitina, coenzima Q10, y fosfatidilserina. La NAC es un precursor del glutatión. El glutatión es un tripéptido tiólico responsable del mantenimiento del estado de óxido-reducción celular y de captar y eliminar RL. Por lo tanto, el glutatión juega un papel fundamental en la protección de las membranas celulares y neuronales frente al daño generado por los RL (Pocernich y col. 2000). La deficiencia de glutatión se ha relacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica. Pocernich y col. (2000) llevan a cabo un estudio en ratones para valorar el efecto antioxidante del glutatión y NAC, demostrando el efecto protector de estas sustancias en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

El estudio de Canter y col. (2007) pone de manifiesto la discrepancia existente en la comunidad científica acerca del empleo de NCs y su efectividad. En su estudio, evalúan el efecto antioxidante de las vitaminas A, C, E y el selenio en el tratamiento de la osteoartritis en personas. La vitamina E es el antioxidante liposoluble más abundante en los tejidos. Por el contrario, la vitamina C es hidrosoluble y también presenta acción antioxidante, protegiendo la célula del envejecimiento (Dowling y Head 2012). Los autores describen una ligera mejoría en el dolor sin encontrar significancia estadística. Sin embargo, no encuentran resultados positivos en el uso de vitamina C ni el conjunto de las dos vitaminas y el selenio. El selenio no es un antioxidante en sí mismo, pero es un componente esencial de la enzima antioxidante glutation-peroxidasa (Canter y col. 2007). Dowling y Head (2012) recogen en su estudio el uso de vitaminas como antioxidantes en combinación con una dieta adecuada, observando mejoras en la memoria de mujeres con Alzheimer.

El ácido  $\alpha$ -lipoico es un ácido graso con poder antioxidante. Sus metabolitos actúan como quelantes de RL, entre ellos los radicales hidroxilo y peróxido. Además, junto a la vitamina C y glutatión, interviene en la reacción de reciclaje de la vitamina E oxidada y es un quelante del hierro y del cobre. El ácido  $\alpha$ -lipoico ha sido empleado con buenos resultados en modelos animales de lesión por isquemia-reperfusión y enfermedades neurodegenerativas (Packer y col. 1995).

El DHA es un ácido graso poliinsaturado (PUFA) de cadena larga perteneciente a la familia de ácidos grasos omega-3. No forma parte de los ácidos grasos esenciales porque una pequeña parte puede ser sintetizada en el organismo a partir del ácido alfa-linoleico. Sin embargo, los niveles plasmáticos y tisulares de DHA van a depender principalmente de la ingesta (Richard y Calder 2016). El DHA forma parte de los fosfolípidos de membrana de las neuronas y es el PUFA más abundante en el encéfalo, especialmente en la sustancia gris, adquiriendo así una vital importancia en el mantenimiento estructural de las células del SNC (Dahms y col. 2016, Weiser y col. 2016). Además de su función estructural, el DHA participa en la neurotransmisión y mantenimiento de los receptores de membrana, plasticidad neurosináptica, neurogénesis, mielinización y neuroinflamación (Weiser y col. 2016). En personas, el DHA presenta un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de las funciones

cognitivas y visuales. Aparece en grandes cantidades en el encéfalo y retina durante el desarrollo embrionario y es aportado por la leche materna para asegurar su correcto desarrollo (Richard y Calder 2016). El suplemento de la dieta con DHA, solo o en combinación con EPA, aporta beneficios en las funciones cognitivas en personas ancianas. Además, se ha demostrado su efectividad para reducir la susceptibilidad del corazón a las arritmias y estabilizar las placas de aterosclerosis (Richard y Calder 2016). En medicina veterinaria también se han observado los efectos beneficiosos de la suplementación de la dieta con DHA. La mayor concentración de DHA durante el desarrollo perinatal mejora las capacidades visuales y cognitivas del cachorro. También se han observado beneficios a nivel cardiovascular, musculoesquelético y renal (Dahms y col. 2016). El estudio llevado a cabo por Dahms y col. (2016) evalúa las concentraciones de DHA alcanzadas en plasma y encéfalo tras suplementación durante 8 semanas o 9 meses. Para ello utilizan Beagles a los que les dan dosis de DHA de hasta 2000mg/kg PV/día. Dahms y col. (2016) no observan signos de toxicidad con las dosis altas empleadas y concluyen que la dosis de 150mg/kg PV/día es suficiente para alcanzar los niveles de DHA en encéfalo en administraciones crónicas.

El EPA, al igual que el DHA, es un PUFA pero con una estructura molecular diferente. El EPA es adquirido con la dieta, aunque una cantidad mínima puede ser sintetizada desde el DHA. El EPA presenta importantes efectos beneficiosos cardiovasculares, mejora la función endotelial y vascular, protege a las células del daño oxidativo, disminuye la concentración de triglicéridos y actúa como modulador de la inflamación, regulando el grado de activación de los macrófagos. Además, se describe efecto anti-hipertensivo, posiblemente asociado a la mejora en la función vascular. A diferencia del DHA, el EPA es capaz de disminuir los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL), mejorando la circulación coronaria (Brinton y Mason 2017).

La fosfatidilserina (FS) es un fosfolípido de membrana muy común en el encéfalo que actúa facilitando la transmisión eléctrica a lo largo de los nervios (Heath y col. 2007). La FS forma parte del componente estructural del retículo endoplásmico, del aparato de Golgi, de las membranas nucleares, de la membrana externa de la mitocondria y de la mielina (Glade y Smith 2015). Con el envejecimiento, la FS presente en las membranas neuronales va siendo sustituida por colesterol, disminuyendo de este modo la viscosidad de la membrana y promoviendo la aparición progresiva de déficits neurológicos. Las neuronas de personas ancianas presentan un 80% menos de

FS que los niños (Glade y Smith 2015). La suplementación de FS en la dieta se ha relacionado con mejoras en la memoria y en el comportamiento exploratorio en el perro (Heath y col. 2007). En estudios llevados a cabo en ratas sanas geriátricas, alimentadas con dietas suplementadas con FS, se observaron mejoras en las comunicaciones interneuronales. Posiblemente, la suplementación de la dieta permitió incorporar mayor cantidad de FS a las membranas neuronales, mejorando así la fluidez de la membrana, facilitando las funciones enzimáticas y la liberación de neurotransmisores. Por consiguiente, el empleo de FS evidenció mejoras en los resultados de los test cognitivos y de memoria a corto plazo (Glade y Smith 2015).

La carnitina es una amina cuaternaria presente en casi todas las especies animales. Está presente en forma de dos enantiómeros, L-carnitina y D-carnitina. La L-carnitina juega un papel importante en el metabolismo lipídico en la célula, mientras que la D-carnitina es fisiológicamente inactiva y presenta efectos tóxicos. La L-carnitina transporta los ácidos grasos de cadena larga desde el citosol hasta el interior de la mitocondria para ser oxidados y producir energía. La L-carnitina puede ser asimilada con los alimentos, especialmente carne, pescado o vegetales, pero también puede ser sintetizada a nivel hepático. Los déficits de L-carnitina se han relacionado con miopatías o enfermedad cardíaca debido al incorrecto metabolismo de las células musculares. La reducción de la concentración celular de L-carnitina con la edad se asocia con un mayor metabolismo glucídico neuronal. Por lo tanto, el exceso de producción de RL va a generar un deterioro más rápido de las funciones neurológicas (Pekala y col. 2011). En medicina veterinaria existen pocos estudios sobre los efectos de la L-carnitina en el perro. Söder y col. (2019) llevan a cabo un trabajo de investigación en 28 perros macho, de raza Labrador Retriever, de los cuales 12 presentaban un índice de masa corporal normal (4-5/9) y 16 tenían sobrepeso (6-8/9). Todos los perros con sobrepeso presentaron niveles plasmáticos de L-carnitina por debajo del rango fisiológico, en comparación con el grupo de perros con índice corporal normal. Este hecho hace sospechar de alguna deficiencia en el metabolismo lipídico como justificación del sobrepeso (Söder y col. 2019).

La coenzima Q-10 (coQ10) es una benzoquinona liposoluble endógena que actúa como transportador de electrones mitocondrial. Resulta imprescindible para la producción de ATP y constituye un potente antioxidante presente en todas las células (Felker 2010, Sarmiento y col. 2016). Además, la coQ10 es un regulador génico que

actúa controlando la expresión de genes responsables del buen funcionamiento mitocondrial y genes relacionados con la inflamación (Martin y col. 2011). La coQ10 está presente en todos los tejidos del cuerpo, pero es sintetizada principalmente en tejidos con alta demanda de energía, como el corazón, los músculos o el encéfalo (Sarmiento y col. 2016). La deficiencia de coQ10 se relaciona con alteraciones en la función mitocondrial y con una mayor producción de RL, lo que conlleva la peroxidación lipídica, su degradación y la instauración de procesos inflamatorios (Martin y col. 2011). Actualmente existe controversia acerca del empleo de suplementos de coQ10. Las estatinas, fármacos empleados en el control del colesterol, bloquean la síntesis endógena de coQ10, pudiendo empeorar el estado clínico de los pacientes cardiopatas que tomen este fármaco. Sin embargo, otros estudios revelan lo contrario (Felker 2010). Martin y col. (2011) llevan a cabo un estudio en Beagles para determinar el efecto del tratamiento a largo plazo con atorvastatina en la función cognitiva. En sus resultados se puede observar que los Beagle que tomaron atorvastatina tuvieron niveles más bajos de coQ10 en plasma. En corteza parietal los niveles fueron parecidos entre el grupo a estudio y el grupo control, aunque los pacientes que mostraron mayores déficits cognitivos presentaron niveles de coQ10 más bajos. Concluyen que el empleo de estatinas en pacientes ancianos puede predisponer a un empeoramiento de un problema cognitivo ya presente (Martin y col. 2011).

## CAPÍTULO 4 — MATERIAL Y MÉTODO

---

El desarrollo de esta tesis doctoral ha dado lugar a la realización de 4 trabajos de investigación de carácter clínico prospectivo:

- Galán-Rodríguez A, Carletti BE, Morgaz-Rodríguez J, Gamito-Gómez A, Muñoz Rascón P, Martín-Suárez EM. (2013) Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations in healthy adult dogs. *Vet Rec* 173(10), 249.
- Galán A, Carletti BE, Morgaz J, Granados MM, Mesa I, Navarrete R, Lombardo R, Martínez CM, Martín-Suárez EM. (2014) Comparative study of select biochemical markers in cerebrospinal fluid of healthy dogs before and after treatment with nutraceuticals. *Vet Clin Pathol* 43(1), 72-77.
- Seisdedos A, Galán A, Carletti B, Quirós S, Funes F, Martín EM, Domínguez JM, Gómez R, Granados MM. (2019) Anesthetic effects of isoflurane and propofol on cerebrospinal fluid biochemical markers in healthy dogs. *Vet Clin Pathol* 48(2), 270-275.
- Galán A, Seisdedos A, Carletti BE, Quirós S, Martín EM, Menor D, Granados MM. (2020) Cisternal versus lumbar cerebrospinal fluid lactate concentration in healthy dogs. *Vet Med (Praha)* 65, 297-300.

En Galán-Rodríguez y col. (2013) se llevó a cabo un estudio preliminar con el objetivo de contribuir a establecer rangos fisiológicos para el lactato, piruvato y ratio L/P en LCR de perros sanos bajo condiciones anestésicas controladas. En Galán y col. (2014) se evaluó el efecto de la suplementación de la dieta con nutraceuticos en determinados biomarcadores del MEC en LCR. Para ello se realizó la suplementación con Aktivait® durante 50 días seguidos y se tomaron mediciones en LCR antes y después de ese periodo. En Seisdedos y col. (2019) se planteó un estudio para valorar cuantitativamente el efecto de los anestésicos (propofol e isofluorano) y el efecto de la duración de la anestesia sobre los biomarcadores del MEC. En este caso, todos los animales fueron anestesiados en dos ocasiones: en un primer periodo se anestesiaron exclusivamente con isofluorano, y en un segundo periodo se hizo sólo con propofol. En Galán y col. (2020) se llevó a cabo una comparación entre los niveles de lactato medidos en CM y CL. Este estudio se desarrolló utilizando el protocolo anestésico empleado en Seisdedos y col. (2019).

Todos los estudios se han llevado a cabo en perros de experimentación de raza Beagle. La investigación ha sido respaldada por la aprobación del Comité de Bioética de

la Universidad de Córdoba, dado que cumplía con los requisitos de la legislación existente sobre experimentación animal (Directiva 86/609CEE y R.D. 1201/2005, de 10 de octubre).

---

### Sujetos de estudio

---

En el estudio Galán-Rodríguez y col. (2013) se emplearon 18 Beagle sanos, 8 hembras esterilizadas y 10 machos castrados. El peso medio fue de 14,2kg, con un rango desde 12,4kg a 16kg. La edad osciló entre 5 y 7 años. En Galán y col. (2014) se emplearon 11 Beagle, 6 hembras y 5 machos. El peso medio fue de 14,3kg (12,6-16kg) y edades de entre 7 y 8 años. En Seisdedos y col. (2019) se incluyen 9 Beagle, 4 hembras y 5 machos, con peso medio de 13,15kg (12,8-13,5kg) y edades entre 4 y 5 años. En Galán y col. (2020) se emplearon 10 Beagle, 5 hembras y 5 machos, con peso medio de 13,4kg (12,8-14kg) y edades comprendidas entre los 3,5 y 4,5 años.

De forma previa a cada uno de los estudios, los animales fueron sometidos a un examen físico general y neurológico exhaustivo. Se llevó a cabo un perfil general con hemograma (LaserCyte, IDEXX Laboratoires) y bioquímica completa (Vet test 8008, IDEXX Laboratoires), radiografía torácica y ecografía abdominal para descartar patologías subyacentes. Ninguno de los animales incluidos en los estudios presentó anomalías en las pruebas realizadas. Con el fin de evitar el sesgo de los datos, no se administraron medicamentos, nutracéuticos ni ningún tipo de suplemento nutricional a los animales previamente a su inclusión en el estudio. Durante el desarrollo de la investigación, los sujetos fueron alimentados dos veces al día con dieta comercial (Daprocán® mantenimiento) y tenían libre acceso al agua.

---

### Anestesia

---

Para la extracción de LCR se llevaron a cabo dos protocolos anestésicos diferentes. En Galán-Rodríguez y col. (2013) y en Galán y col. (2014) se llevó a cabo un protocolo anestésico estándar. Para Seisdedos y col. (2019) y Galán y col. (2020) se empleó un

protocolo de un solo fármaco anestésico, con el objetivo de evaluar las alteraciones que pueden causar el propofol o isoflurano en los marcadores del MEC. En todos los sujetos se colocó un catéter de 24G (0,7 x 19 mm Vasocan; B. Braun, Melsungen AG, Alemania) en la vena cefálica durante la preparación pre-anestésica. Todos los animales fueron pre-oxigenados durante 5 minutos con mascarilla y oxígeno al 100%.

En Galán-Rodríguez y col. (2013) y en Galán y col. (2014) todos los perros se premedicaron con medetomidina 3µg/kg/IM (Domtor, Pfizer SA. Madrid, España) y butorfanol 0,3mg/kg/IM (Butomidol, Richterpharma Ag, Austria). La inducción anestésica se llevó a cabo con 4 mg/kg/IV de propofol (Propofol-Lipuro 1%; B. Braun, Barcelona, España) 5 minutos después de la premedicación. Tras la intubación endotraqueal (Mallinckrodt Medical, Atlone, Irlanda), la anestesia es mantenida con isoflurano (Isovet, B. Braun VetCare SA, Barcelona, España) en oxígeno al 100% con un flujo de 50 ml/kg/min utilizando un circuito circular con reinhalación de gases (Excel 210SE; Ohmeda, Louisville, KY, USA). La frecuencia cardíaca, presiones arteriales, temperatura y oxigenación sanguínea fueron monitorizadas durante toda la anestesia.

En Seisedos y col. (2019) y en Galán y col. (2020) se siguió un protocolo anestésico exclusivamente con propofol o con isoflurano, sin emplear fármacos pre-anestésicos, con el objetivo de reducir al mínimo el sesgo de los datos. Además, son dos de los agentes anestésicos más empleados en la clínica veterinaria, por lo que los resultados derivados de esta tesis tendrán una mayor aplicabilidad. Todos los perros fueron anestesiados en dos periodos diferentes separados por un mes. En un primer periodo los perros fueron anestesiados exclusivamente con propofol (grupo-Propo). Tras la pre-oxigenación con mascarilla y oxígeno al 100% durante 5 minutos, se induce la anestesia con 6-8 mg/kg/IV de propofol. Tras la intubación endotraqueal, la anestesia se mantiene con una TIVA de propofol a 0,4-0,6 mg/kg/min. En el segundo periodo, los perros fueron inducidos utilizando mascarilla con isoflurano al 5% en oxígeno al 100% (grupo-Iso). Durante el mantenimiento, el End-tidal (Et) de isoflurano fue mantenido entre 1,3% y 1,5%. Tanto en la anestesia con propofol como en la anestesia con isoflurano, los perros fueron ventilados mecánicamente (7900 SmartVent Ventilator, GE Healthcare, Finlandia) para mantener la normocapnia. La frecuencia cardíaca, presiones arteriales, temperatura, Et CO<sub>2</sub> y oxigenación arterial fueron monitorizadas durante toda la anestesia.

Durante los procedimientos se monitorizaron los tiempos de intubación y extubación y los tiempos de extracción de LCR. Todos los animales se recuperaron satisfactoriamente del procedimiento, independientemente del protocolo anestésico utilizado.

---

### Obtención de líquido cefalorraquídeo y análisis

---

Para la extracción de LCR se siguió una técnica estéril estándar, descrita en la revisión bibliográfica apartado 3.2.2 (De la Hunta y Glass 2009) mediante punción con aguja espinal de 20G y 3,81 cm (Becton-Dickinson and Company, New Jersey, USA). En cada extracción se obtuvieron 1,5 ml de LCR (<1 ml por cada 5 kg de peso), los cuales se dividieron inmediatamente en dos alícuotas de 0,5 ml y 1 ml, respectivamente. En todas las muestras se valoró inicialmente el color y claridad del LCR. En Galán-Rodríguez y col. (2013) la extracción de LCR se produjo en los 10-15 minutos posteriores a la inducción anestésica, cuando el animal estaba en plano anestésico adecuado y hemodinámicamente estable. La alícuota de 1 ml fue empleada para hacer el recuento de células nucleadas (RCN) y glóbulos rojos (RGR) (Hemocitómetro de Neubauer, Nahita, Gab Sistemática Analítica SL, Barcelona, España) mediante tinción con azul de metileno (Platt y Garossi 2012). Con la misma alícuota se llevó a cabo la medición de PT mediante espectrofotometría (método colorimétrico de rojo de pirogalol (Biosystem A15; Atom, Barcelona, España)) y glucosa [reacción oxidasa/peroxidasa mediante espectrofotometría (Biosystem A15; Atom, Barcelona, España)]. La alícuota de 0,5 ml fue inmediatamente congelada y conservada a -20°C durante 5 días hasta que fueron enviadas a un laboratorio externo (Laboratorio Veterinario Garfia SL, Córdoba, España). En esta alícuota se midió la concentración de lactato (ADVIA 1800 Siemens, Barcelona, España) y piruvato (Analizador A25 Biosystem; BEN, S.r.l., Roma, Italia) empleando técnicas de espectrometría de absorción molecular y el ratio L/P. Las muestras fueron recogidas en un periodo de 2 semanas (2 perros al día).

En Galán y col. (2014), empleando la misma técnica de extracción de LCR en CM, se llevaron a cabo dos extracciones de LCR separadas por 50 días, ambas a los 10-15 minutos de la inducción. La primera extracción se produjo antes de iniciar el

tratamiento con NC (Aktivait VetPlus S.L., Barcelona, España). En esta tesis se decidió emplear Aktivait® como NC por ser un producto muy completo, ampliamente distribuido y con ensayos clínicos que respaldan su empleo. La segunda extracción se llevó a cabo 50 días después de iniciar el tratamiento. Las muestras fueron recogidas en un periodo de 4 días (2-3 perros por día). En cada punción se obtuvieron 1,5 ml de LCR que se dividieron en 2 alícuotas de 0,5 y 1 ml, respectivamente. En la alícuota de 1 ml se llevaron a cabo las mismas mediciones descritas en Galán-Rodríguez y col. (2013) (RCN, RGR, PT y glucosa). En este caso, en la alícuota de 0,5ml, además de lactato, piruvato y ratio L/P, se midió la concentración de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Esta alícuota fue conservada a  $-80^\circ\text{C}$  durante 6-9 días hasta que fueron enviadas en conservación en hielo seco al laboratorio veterinario externo Garfia SL. Tanto antes de iniciar el tratamiento con Aktivait® como después, se obtuvo una muestra de sangre venosa para realizar hemograma completo y bioquímica, incluyendo PT, urea, creatinina, ALP y ALT. Para la administración de Aktivait® se siguieron las recomendaciones del fabricante, 1 comprimido cada 24 horas. Para asegurar la toma del comprimido, éste se colocó de forma manual al fondo de la cavidad oral y se estimuló el reflejo deglutor. Tras 2-3 ingestas, los animales aceptaron el comprimido de forma voluntaria directamente de la mano.

En Seisededos y col. (2019) se realizaron 4 extracciones de LCR a cada animal. Todos los perros fueron sometidos a dos anestias y en cada anestesia se extrajo LCR en dos ocasiones, una a los 15 minutos de la inducción [Tiempo 0 (T0)] y otra a las 3 horas (T3). Cada muestra se dividió en dos alícuotas de 0,5 y 1 ml. En cada muestra de LCR se valoró coloración y claridad, RCN, RGR, PT y glucosa como en los otros estudios. Además se tomaron mediciones de la concentración de CK mediante espectrofotometría (Biosystem A15; Atom, Barcelona, España) y  $\text{Ca}^{+2}$  iónico mediante electrodo selectivo (Bayer Diagnostics, Barcelona, España) y electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) mediante un gasómetro convencional (Ciba Corning 800, Bayer Diagnostic, Barcelona, España). La alícuota de 0,5 ml se conservó en congelación a  $-20^\circ\text{C}$  durante 6-9 días para enviarlas a un laboratorio externo (IDEXX Laboratory, Barcelona, España) para medición de lactato (ADVIA 1800 Siemens, Barcelona, España), piruvato y glutamato (mediante cromatografía líquida de alta resolución con Analizador A25 Biosystem; BEN, S.r.l., Roma, Italia). Inmediatamente después de la extracción de LCR se procedió a obtener una muestra de sangre venosa (venopunción periférica) y arterial (desde un

catéter previamente colocado en la arteria podal dorsal). La muestra venosa se conserva en un tubo con heparina sódica (Vacutainer, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) hasta su centrifugación para obtener plasma para medir  $\text{Ca}^{+2}$  iónico y electrolitos. La sangre arterial fue inmediatamente procesada para medir el estado ácido-base. La extracción de LCR se llevó a cabo en 1 semana (1-2 perros por día).

La obtención del LCR para la comparación de la concentración de lactato en CM y CL en Galán y col. (2020) se llevó a cabo durante la anestesia descrita en Seisdedos y col. (2019). Antes de realizar la primera extracción de LCR de CM en Seisdedos y col. (2019), a los 15 minutos de la inducción, se hizo la extracción de CL para el estudio comparativo de niveles de lactato entre CM y CL. Para la realización de este estudio empleamos 5 perros del trabajo previo de Seisdedos y col. (2019). Inicialmente se tomaron muestras de LCR de CM y de CL en 5 perros anestesiados exclusivamente con propofol. Posteriormente se realizó la extracción de LCR en esos mismos 5 perros cuando fueron anestesiados con isofluorano.

---

### Análisis estadístico

---

En Galán-Rodríguez y col. (2013) y Galán y col. (2014), se llevó a cabo el análisis descriptivo para cada parámetro con el paquete estadístico SPSS V.15.0.0 (SPSS, Headquarters, Chicago, Illinois, USA). Además del estudio de los estadísticos descriptivos, en Galán y col. (2014) se empleó el test Wilcoxon para analizar las diferencias entre los parámetros antes y después del tratamiento con Aktivait®. El nivel de significancia se fijó en  $P \leq .05$ .

En Seisdedos y col. (2019) y en Galán y col. (2020), se empleó el paquete estadístico SPSS V.18.0 (SPSS, Headquarters, Chicago, Illinois, USA). Para Seisdedos y col. (2019), debido al tamaño muestral, se llevó a cabo la prueba de Friedman para análisis de la varianza de dos factores ( $P = 0,002$ ). En Galán y col. (2020) se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de la distribución. Se utilizó la prueba T-Student para muestras relacionadas con el objetivo de comparar las concentraciones de lactato en CM y CL. El nivel de significancia estadística quedó fijada en  $P \leq .05$ .

## CAPÍTULO 5 — RESULTADOS

---

---

## ESTUDIO 1

---

Galán-Rodríguez A, Carletti BE, Morgaz-Rodríguez J, Gamito-Gómez A, Muñoz Rascón P, Martín-Suárez EM. (2013) Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations in healthy adult dogs. *Vet Rec* 173(10), 249.

El tiempo anestésico, tiempo desde la inducción anestésica hasta que se cierra el vaporizador, osciló entre 13 y 19 minutos, con un tiempo medio de 15,27 minutos. Los resultados del hemograma y de la bioquímica sérica no mostraron alteraciones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo. El valor medio del lactato sérico obtenido fue de 1,8 mM/L (1,1-2,98 mM/L) y el del piruvato 0,16 mM/L (0,05-0,19 mM/L). En todos los casos, las muestras de LCR reflejaron valores dentro del rango de referencia para RCN (< 5 células/ $\mu$ l), RGR (< 500 células/ $\mu$ l) y PT (<30 mg/dl). Todas las muestras obtenidas de LCR fueron claras y transparentes. En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos para cada parámetro medido en LCR y suero en cada animal. En la Tabla 3 se resumen los estadísticos descriptivos de los parámetros evaluados. No se encontraron correlaciones significativas entre lactato-piruvato en LCR, entre lactato-piruvato en suero, entre el RCN-lactato en LCR ni entre la concentración de piruvato en suero y LCR con el tiempo anestésico (Tabla 4).

**TABLE 1: CSF TNCC, RBCC, protein, glucose and lactate and pyruvate concentrations and their ratio and serum lactate and pyruvate concentrations in 18 adult healthy dogs**

Dog and sex	Age (years)	Weight (kg)	TNCC (cells/ $\mu$ l)	RBCC cells/ $\mu$ l	Protein (mg/dl)	Glucose CSF/ blood (mg/dl)	CSF pyruvate mM/l	CSF lactate mM/l	CSF ratio L/P	Serum pyruvate mM/l	Serum lactate mM/l	Anaesthetic times (minutes)
1 F	5	13	1	75	17	60/110	0.080	1.430	17.875	0.12	1.97	17
2 F	5	12.4	2	98	13	56/96	0.151	1.540	10.198	0.09	1.30	13
3 F	5	14	1	67	18	56/93	0.135	1.580	11703	0.76	1.29	15
4 F	5	13.6	1	148	23	52/89	0.030	1.850	61.660	0.19	1.45	15
5 F	5.5	15.2	3	142	9	67/116	0.011	1.410	128.180	0.14	1.38	16
6 F	5.5	15.7	1	100	21	71/115	0.028	1.530	54.642	0.15	1.52	13
7 F	5.5	16	1	113	14	66/109	0.020	1.510	75.500	0.13	1.48	17
8 F	6.5	15.2	3	93	11	65/106	0.010	1.610	161.000	0.08	1.92	19
9 M	6.5	14.8	3	75	17	70/110	0.085	1.250	14.705	0.15	2.11	15
10 M	6.5	13.7	2	86	24	55/97	0.138	1.830	13.260	0.08	1.31	17
11 M	6.5	15	1	93	12	50/86	0.013	1.370	105.384	0.23	2.22	14
12 M	7	15.6	2	72	10	55/95	0.060	1.010	16.830	0.18	1.10	14
13 M	7	15.4	3	81	16	74/120	0.043	0.980	22.790	0.05	1.45	13
14 M	7	14.9	1	96	14	71/121	0.069	0.520	7.530	0.07	2.56	15
15 M	7	14.7	3	105	21	69/118	0.012	0.530	53.000	0.12	2.98	14
16 M	7	15.5	2	115	22	67/112	0.068	0.455	6.690	0.12	2.10	16
17 M	7	14.9	2	97	14	60/96	0.020	0.588	29.400	0.08	2.67	17
18 M	7	14.3	2	69	17	64/108	0.068	0.416	6.110	0.17	1.76	15

F, Female; M, Male; RBCC, Red blood cell count; TNCC, Total nucleated cell count

TABLA 2: Resumen de los datos de edad, peso y tiempo anestésico empleado en la obtención de las muestras en cada sujeto a estudio. Valores de RCN, RGR, PT, glucosa, lactato, piruvato y ratio L/P en LCR de cada sujeto a estudio. Se muestran los valores de lactato y piruvato en suero.

**TABLE 2: Descriptive statistical analysis of tested parameters**

	TNCC cells/ $\mu$ l	RBCC cells/ $\mu$ l	Protein mg/dl	CSF glucose	Blood glucose	CSF pyruvate	CSF lactate	Ratio L/P	Serum lactate mM/l	Serum pyruvate mM/l
Mean	1.888	95.833	16.277	62.666	105.388	0.0577	1.189	44.247	1.809	0.162
Median	2.000	94.500	16.500	64.500	108.500	0.0515	1.390	20.332	1.64	0.125
sd	0.832	22.935	4.547	7.324	11.062	0.0461	0.492	46.190	0.540	0.156
Minimum	1.00	67.00	9.00	50.00	86.00	0.010	0.416	6.110	1.10	0.05
Maximum	3.00	148.00	24.00	74.00	121.00	0.151	1.850	161.000	2.98	0.76
Range	2.00	81.00	15.00	24.00	35.00	0.141	1.434	154.890	1.88	0.71

CSF, Cerebrospinal fluid; TNCC, Total nucleated cell count

TABLA 3: Resumen de los estadísticos descriptivos.

**TABLE 3: Correlation between CSF lactate and pyruvate concentrations and serum lactate and pyruvate concentrations, CSF lactate and pyruvate concentrations and TNCC and CSF lactate and pyruvate concentrations and anaesthetic time (Spearman's correlation)**

	CSF lactate mM/l	Serum lactate mM/l	CSF pyruvate mM/l	Serum pyruvate mM/l	Anaesthetic times (minutes)	RBCC cells $\mu$ l
<i>Spearman's r</i>						
CSF lactate (mM/l)						
Correlation coefficient	1.000	-0.542 (*)	0.084	0.170	0.173	0.163
Sig. (bilateral)		0.020	0.741	0.500	0.493	0.518
N	18	18	18	18	18	18
Serum lactate (mM/l)						
Correlation coefficient	-0.542 (*)	1.000	-0.339	-0.256	0.163	0.162
Sig. (bilateral)	0.020		0.169	0.305	0.517	0.520
N	18	18	18	18	18	18
CSF pyruvate (mM/l)						
Correlation coefficient	0.084	-0.339	1.000	-0.026	-0.131	-0.521 (*)
Sig. (bilateral)	0.741	0.169		0.919	0.604	0.027
N	18	18	18	18	18	18
Serum pyruvate (mM/l)						
Correlation coefficient	0.170	-0.256	-0.026	1.000	-0.234	-0.147
Sig. (bilateral)	0.500	0.305	0.919		0.350	0.561
N	18	18	18	18	18	18
Anaesthetic times (minutes)						
Correlation coefficient	0.173	0.163	-0.131	-0.234	1.000	0.121
Sig. (bilateral)	0.493	0.517	0.604	0.350		0.633
N	18	18	18	18	18	18
RBCC (cells $\mu$ l)						
Correlation coefficient	0.163	0.162	-0.521 (*)	-0.147	0.121	1.000
Sig. (bilateral)	0.518	0.520	0.027	0.561	0.633	
N	18	18	18	18	18	18

\*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)  
CSF, Cerebrospinal fluid; N, size of sample; RBCC, Red blood cell count; Sig, statistical significance; TNCC, Total nucleated cell count

TABLA 4: Tabla resumen de la correlación entre las diferentes variables medidas en suero y LCR.

## ESTUDIO 2

Galán A, Carletti BE, Morgaz J, Granados MM, Mesa I, Navarrete R, Lombardo R, Martínez CM, Martín-Suárez EM. (2014) Comparative study of select biochemical markers in cerebrospinal fluid of healthy dogs before and after treatment with nutraceuticals. *Vet Clin Pathol* 43(1), 72-77.

Todas las muestras de LCR obtenidas fueron transparentes y sin turbidez. El RCN y las PT en LCR fueron similares entre las muestras obtenidas antes y después del tratamiento con Aktivait®. Todos los valores de los marcadores del MEC medidos en LCR se muestran en la Tabla 5. Biomarcadores como el Na<sup>+</sup> (P = .026) y la glucosa (P = .009) aumentaron significativamente (P ≤ .05) tras el tratamiento. Biomarcadores como el lactato (P = .016) y el ratio L/P (P = .05) disminuyeron significativamente tras el tratamiento (P ≤ .05) (Figura 9). Ningún otro marcador medido en LCR mostró variaciones significativas. Los niveles séricos de Na<sup>+</sup> (P = .046) y Cl<sup>-</sup> (P = .043) aumentaron significativamente tras la administración de Aktivait®, mientras que los niveles séricos de creatinina descendieron significativamente (P = .007) (Tabla 6). El resto de parámetros del hemograma y bioquímica sérica se mantuvieron sin cambios significativos tras el tratamiento.

Variable	Aktivait for 50 Days		P-Values
	Before	After	
Potassium (mM/L)	2.96 (2.73–3.13)	3.19 (2.51–3.30)	0.092
Chloride (mM/L)	132 (124–141)	137 (119–149)	0.350
Sodium (mM/L)	151 (143–164)	160 (141–178)	0.026
Total Protein (g/dL)	21 (12–27)	13 (13–22)	0.109
Glucose (mg/dL)	59 (51–64)	73 (53–83)	0.009
Lactate (mM/L)	1.53 (1.25–1.85)	1.21 (0.87–1.86)	0.016
Piruvate (mM/L)	0.028 (0.011–0.151)	0.098 (0.025–0.176)	0.155
Ratio L/P	16.2(10.2–128.1)	9.9 (4.9–90.0)	0.050

Data are means (minimum–maximum).

TABLA 5: Marcadores del MEC medidos en LCR en 11 Beagle sanos antes y después del tratamiento durante 50 días con un NC (Aktivait®).

Parameters	Aktivait for 50 Days		P-Value
	Before	After	
HCT	48 (43–58)	55(48–59)	0.273
WBC	9.3 (7.0–14.4)	8.7 (5.6–9.3)	0.465
Platelets	290 (280–360)	226 (201–352)	0.998
Lactate (mM/L)	1.52 (1.31–2.12)	2.08 (1.24–2.38)	0.600
Potassium (mM/L)	4.1 (3.0–4.7)	4.7 (2.8–5.2)	0.083
Chloride (mM/L)	110 (108–112)	121 (118–1.25)	0.043
Sodium (mM/L)	141 (138–146)	149 (145–153)	0.046
Creatinine (mg/dL)	1 (0.6–1.3)	0.6 (0.5–0.9)	0.007
Urea (mg/dL)	29 (21–41)	27 (30–35)	0.154
Total Protein (g/dL)	5.6 (5.2–6.4)	5.6 (5.3–5.9)	0.593
ALP (U/L)	60 (20–85)	60 (29–79)*	0.933
ALT (U/L)	37 (29–58)	46 (33–65)*	0.233
Glucose (mg/dL)	78 (67–94)	87 (82–89)	0.066

Data are median (minimum–maximum).

TABLA 6: Valores sanguíneos del hemograma y bioquímica sérica medidos en 11 Beagle antes y después de 50 días de tratamiento con NC (Aktivait®).

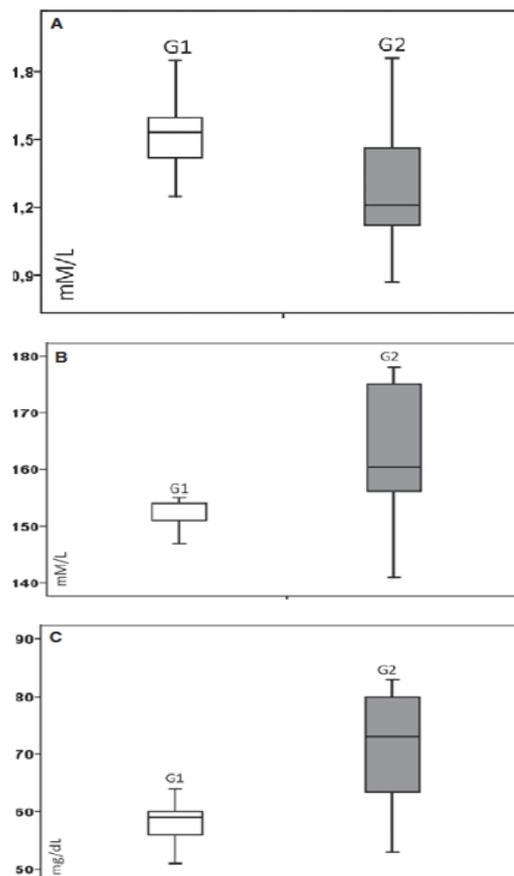


FIGURA 9: Gráfico de cajas y bigotes donde se representan los cambios significativos ( $P < 0,05$ ) en (A) lactato, (B)  $\text{Na}^+$  y (C) glucosa en LCR de 11 Beagle. Los valores identificados con G1 son previos al tratamiento y los identificados con G2 son posteriores al tratamiento con NC (aktivait®). Las líneas horizontales superior e inferior en cada caja representan el percentil 25 y 75. La línea horizontal que atraviesa cada caja representa la mediana. Los bigotes son la representación gráfica de los valores máximos y mínimos.

## ESTUDIO 3

Seisedos A, Galán A, Carletti B, Quirós S, Funes F, Martín EM, Domínguez JM, Gómez R, Granados MM. (2019) Anesthetic effects of isoflurane and propofol on cerebrospinal fluid biochemical markers in healthy dogs. *Vet Clin Pathol* 48(2), 270-275.

En el grupo-Propo, la dosis media para la inducción anestésica fue de  $7,4 \pm 1,06$  mg/kg/IV. Para el mantenimiento anestésico se empleó una infusión continua de propofol a  $0,52 \pm 0,17$  mg/kg/min. En el grupo-Iso, el valor medio de Et durante el mantenimiento fue de  $1,5 \pm 0,16\%$ .

Todas las muestras de LCR obtenidas fueron claras y transparentes, con RCN < 5 células/ $\mu$ l y recuento de PT < 30 mg/dl. El análisis de los biomarcadores del MEC en LCR mostró importantes diferencias entre grupos (Tabla 7). Los resultados reflejaron diferencias significativas entre las concentraciones de lactato en LCR en T0 y T3 (prueba de Friedman para análisis de la varianza de dos factores.  $P = 0,002$ ). La comparación *post hoc* por parejas mostró que la concentración de lactato en LCR fue significativamente más baja en el grupo-Propo que en el grupo-Iso en T3 ( $P = .001$ ). El piruvato, glutamato, glucosa, CK,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{+2}$  iónico permanecieron constantes en el tiempo anestésico y sin diferencias significativas asociadas al agente anestésico empleado. El estado ácido-base arterial,  $\text{HCO}_3^-$  y electrolitos no registraron anomalías. No se observaron fluctuaciones entre grupos, ni tampoco en la duración de la anestesia (Tabla 8, Figura 10). La Tabla 9 representa la comparación de los valores de glucosa obtenidos en LCR y sangre en relación al tiempo y agente anestésico empleado.

	Lactato (mM/L)	Piruvato (mM/L)	Ratio L/P	Glutámico (µmol/L)	Glucosa (mg/dL)	CK (U/I)	TP (mg/dL)	Na <sup>+</sup> (mM/L)	K <sup>+</sup> (mM/L)	Ica <sup>2+</sup> (mg/dL)	Cl <sup>-</sup> (mM/L)
<b>ISO T0</b>	1,43(1,35-1,6)	0,01 (0,004-0,06)	143	8,89(4,4-14,8)	104,00(93-139)	54,00 (42-84)	8,70 (4,4-15,3)	147,95 (145,7-150,9)	2,78 (2,81)	1(0,97-1,01)	129,50 (125-134)
<b>ISO T3</b>	1,58(1,24-2,09)	0,04 (0,02-0,16)	39,5	11,20(5,4-13,7)	105,00(62-145)	127,00 (76-149)	8,40 (6,5-19,6)	148,50 (140,9-157,1)	2,84 (2,68-3,13)	0,96(0,89-1)	127,00 (126-135)
<b>PROPO T0</b>	1,4(1,04-1,71)	0,1 (0,090-0,098)	14	10,70(6,72-14,1)	113,00(95-146)	74,50 (39-95)	11,90 (6,5-11,8)	147,20 (143,6-154,3)	2,86 (2,74-2,95)	0,97(0,95-1,01)	129,50 (128-132)
<b>PROPO T3</b>	1,02(0,75-1,25)	0,12 (0,07-0,16)	8,5	12,00(7,43-14,4)	112,00(86-153)	128,00 (50-143)	7,60(5-14)	148,40 (143-149,9)	2,83 (2,47-2,89)	0,96(0,91-0,99)	128,00 (121-131)

TABLA 7: Marcadores del MEC en LCR medidos durante la anestesia, mostrando los valores medios e intervalos entre paréntesis.

	PH	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> REAL (mM/L)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> STD (mM/L)	Lactato (mM/L)	CK (U/I)	Glucosa (mg/dL)	Na <sup>+</sup> (mM/L)	K <sup>+</sup> (mM/L)	Ica <sup>2+</sup> (mg/dL)	Cl <sup>-</sup> (mM/L)
<b>ISO T0</b>	7,28 (7,14-7,37)	45,90(38-47,90)	356,60 (339,9-430,1)	21,80 (13,8-25)	20,40 (16,3-24,2)	2,04 (1,26-3,16)	118,00 (85-207)	132,42 (101-159)	124,60 (119,5-130)	3,58 (3,28-3,91)	0,78 (0,69-0,99)	103,00 (98-107)
<b>ISO T3</b>	7,28 (7,22-7,42)	45,90 (36,9-49,1)	376,40 (338,7-419)	21,40 (17,5-23,6)	20,30 (16,5-24,3)	1,98 (1,37-2,81)	119,85 (65-174)	140,28 (87-174)	124,70 (115,7-144)	4,02 (3,69-4,55)	0,84 (0,75-1,19)	105,00 (101-113)
<b>PROPO T0</b>	7,33 (7,16-7,38)	39,20 (37,1-44,2)	403,60 (314-495,3)	18,95 (15,6-25,5)	19,35 (14,9-24,9)	1,36 (0,82-1,94)	126,75 (73-223)	135,25 (108-157)	128,70 (116,3-140,8)	3,48 (3,22-3,76)	0,85 (0,74-1,14)	104,00 (96-116)
<b>PROPO T3</b>	7,27 (7,19-7,33)	37,55(34-38,6)	400,90 (376-447,10)	16,90 (14,1-19,3)	17,35 (14,1-20)	1,16 (0,85-1,93)	125,12 (75-255)	149,12 (114-182)	119,50 (109,3-135,9)	3,43 (3,21-3,75)	0,73 (0,56-0,96)	102,50 (96-114)

TABLA 8: Estado ácido-base (gasometría arterial) y marcadores del MEC medidos en sangre venosa durante la anestesia, mostrando los valores medios y los intervalos entre paréntesis.

	GLUCOSA EN LCR (MG/DL)	GLUCOSA EN SANGRE (MG/DL)	PORCENTAJE
<b>ISO T0</b>	103,85	132,42	78,42%
<b>ISO T3</b>	110,85	140,28	79,02%
<b>PROPO T0</b>	118,75	135,25	87,8%
<b>PROPO T3</b>	117,71	149,12	78,93%

TABLA 9: Valores medios de la concentración de glucosa en sangre y LCR. Los valores se expresan en mg/DL. El porcentaje representa la concentración de glucosa en LCR con respecto a la sangre.

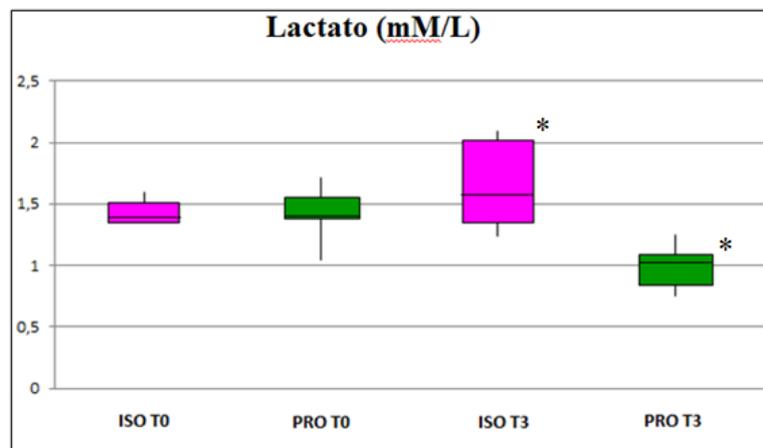


FIGURA 10: Gráfico de cajas y bigotes en el que se observan las concentraciones de lactato (Mm/l) en LCR en 9 Beagle. El gráfico muestra las diferencias en relación al tiempo anestésico, mostrando lo valores de lactato a los 15 minutos post-inducción (T0) y a las 3 horas post-inducción (T3). También se valora el agente anestésico empleado, comparando isoflurano (cajas moradas) y el propofol (cajas verdes). Las cajas representan el rango intercuartílico (IQR), con la mediana representada por la línea central. Los bigotes representan medidas máximas y mínimas, hasta 1,5 x IQR. \* Muestra las diferencias significativas. En este estudio se empleó el test de Friedman para análisis de la varianza de dos factores (P = 0,002).

## ESTUDIO 4

Galán A, Seisdedos A, Carletti BE, Quirós S, Martín EM, Menor D, Granados MM. (2020) Cisternal versus lumbar cerebrospinal fluid lactate concentration in healthy dogs. *Vet Med (Praha)* 65, 297-300.

Todas las muestras de LCR fueron de aspecto claro y transparentes. Todas las muestras presentaron valores de RCN ( $< 5$  Células/ $\mu$ l), de RGR ( $< 500$  células/ $\mu$ l) y de PT ( $< 30$  mg/dl) dentro del rango de referencia. La concentración media de lactato en CM fue de  $1,44 \pm 0,06$  mM/L (rango de 1,04-1,6 mM/L) y en CL de  $1,58 \pm 0,1$  mM/L (1,45-2,03 mM/L) (Figura 12).

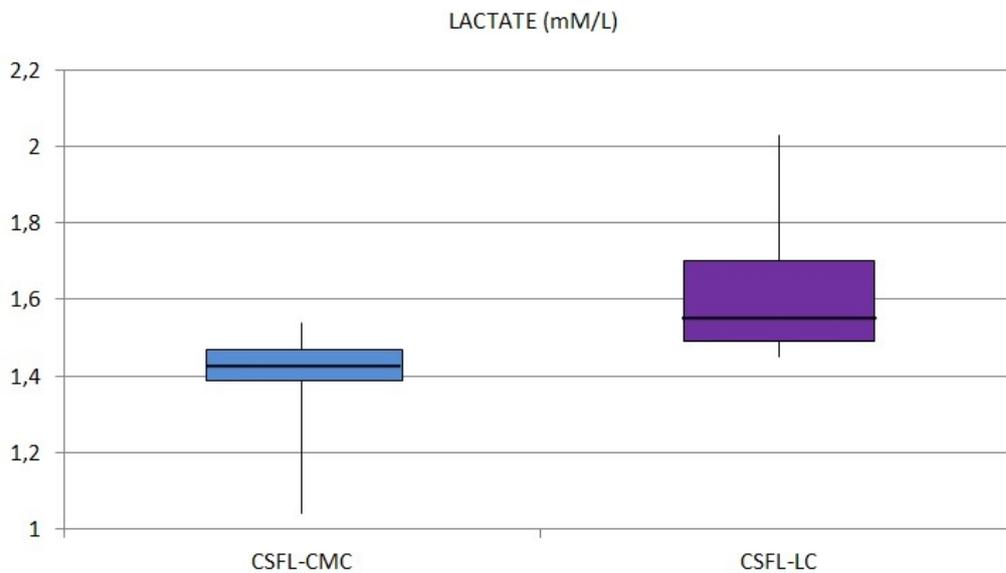


FIGURA 11: Gráfico de cajas y bigotes que refleja la concentración de lactato en LCR en 10 Beagle y la diferencia en función del lugar de punción (CM vs CL). Los cajones representan el rango intercuartílico, la línea central en cada cajón representa el valor mediano. Los bigotes representan los valores máximos y mínimos, hasta  $1,5 \times$  IQR. los valores de lactato en CM están representados en azul. los valores de lactato en CL están representados en morado. Se realiza la prueba T-student para muestras relacionadas ( $P=0,05$ ). CSFL-CMC: Lactato en LCR en CM. CSFL-LC: Lactato en LCR en CL

## CAPÍTULO 6 — DISCUSIÓN

---

La discusión del trabajo realizado en esta tesis doctoral se ha dividido en función de los artículos publicados, tal y como se plantea a continuación:

---

### ESTUDIO 1

---

Galán-Rodríguez A, Carletti BE, Morgaz-Rodríguez J, Gamito-Gómez A, Muñoz Rascón P, Martín-Suárez EM. (2013) Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations in healthy adult dogs. *Vet Rec* 173(10), 249.

El lactato es un subproducto del metabolismo de la glucosa (Pang y Boysen 2007) y es empleado por la neurona para producir energía y mantener el potencial de membrana (Smith y col. 2003). El lactato, al ser considerado como parte fundamental en el metabolismo energético neuronal, ha sido empleado por numerosos estudios, tanto en medicina humana (Cunha 2011, Leen y col. 2012, Liguori y col. 2015), como veterinaria (Yin y col. 2001, Pugliese y col. 2005, Sullivan y col. 2009, Witsberger y col. 2012, Caines y col. 2013, Mariani y col. 2019) como biomarcador del MEC en LCR.

En nuestro estudio valoramos la concentración de lactato en CM en 18 Beagle sanos. El tamaño muestral fue seleccionado atendiendo a los criterios éticos en base a la normativa del Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba (Directiva 86/609CEE y R.D. 1201/2005, de 10 de octubre), cuyo objetivo es el empleo del menor número de animales para la obtención de resultados estadísticamente significativos cuando se trata de procedimientos cruentos. A pesar de no ser una muestra de tamaño elevado, nuestro estudio aporta un grupo homogéneo de pacientes a estudio cuyo número está por encima de otros trabajos previamente publicados (Yin y col. (2001) utilizaron 11 perros como grupo control, Pugliese y col. (2005) emplearon 11 perros, Witsberger y col. (2012) utilizaron 16 perros). Mariani y col. (2019) para su estudio sobre lactato en LCR en perros con enfermedad inflamatoria del SNC emplearon 102 pacientes. Sin embargo, en este estudio no se emplea grupo control.

Nuestros resultados muestran valores de lactato medio de 1,189 mM/L, con valores mínimos y máximos de 0,416 y 1,850 mM/L respectivamente. La mediana se

establece en 1,39 mM/L. En el estudio de Witsberger y col. (2012) obtuvieron una mediana para el grupo control de 1,33 mM/L (1,13-1,58 mM/L). Si bien los valores de mediana se correlacionan en ambos estudios, los valores mínimos (1,13 mM/L) y máximos (1,58 mM/L) difieren, particularmente los valores mínimos. Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Caines y col. (2013) con respecto a Witsberger y col. (2012). El trabajo de Caines y col. (2013) aporta un valor medio de lactato en LCR (1,6 mM/L) similar al obtenido en nuestro estudio (1,189 mM/L). Sin embargo, el valor mínimo en su estudio (1,1 mM/L) difiere mucho del nuestro (0,416 mM/L). Las diferencias observadas entre estos valores en ambos estudios pueden estar justificadas principalmente por el protocolo anestésico empleado y el tiempo de extracción de las muestras. En nuestro estudio, todas las muestras fueron obtenidas a los 15 minutos de la inducción anestésica. En el trabajo de Witsberger y col. (2012), las muestras se obtuvieron dentro de las primeras 18 horas desde el ingreso del paciente en el hospital. En el estudio de Caines y col. (2013), los autores obtienen las muestras de LCR en tiempos diferentes dentro del mismo grupo control. Su grupo control estaba compuesto por perros que se sometieron a RM por una patología no neurológica (en los cuales la extracción de LCR se llevó a cabo tras la RM) y un grupo de perros sanos sometidos a esterilización (en los cuales la extracción se realizó tras la inducción anestésica). Como se describe en Seisdedos y col. (2019), los niveles de lactato presentan una tendencia al alza a las 3 horas de la inducción anestésica en los pacientes anestesiados con isoflurano. En base a esto, las variaciones en los niveles de lactato en los estudios que hemos comentado previamente pueden deberse principalmente al momento de extracción de LCR.

La heterogeneidad del grupo control empleado por Witsberger y col. (2012) y Caines y col. (2013), con perros de diferentes edades y razas, puede justificar los valores mínimos más altos obtenidos en sus estudios. Leen y col. (2012) obtienen valores más altos de lactato en LCR en personas ancianas que en personas jóvenes. Esto mismo podría suceder en el perro; sin embargo, hasta la fecha no hay publicaciones sobre la variación del lactato en función de la edad en esta especie. De la misma manera, a conocimiento del autor, no existen estudios en medicina veterinaria que demuestren diferencias en la concentración de lactato en función de la raza. En medicina humana, estudios como los de Van der Merwe y col. (1999) o Bret y col. (2013) ponen de manifiesto ciertas diferencias en las concentraciones de lactato en

función de la clase étnica, por lo que resultaría interesante llevar a cabo estudios poblacionales para corroborar esto en medicina veterinaria. En nuestro estudio empleamos solo perros de raza Beagle. Sin embargo, Witsberger y col. (2012) utilizaron razas diferentes (Labrador Retriever, Red Bone Hound, Blue Tick Hound y mestizos), mientras que Caines y col. (2013) incluyeron principalmente Beagle pero también Labrador Retriever, Golden Retriever, diferentes perros de caza y mestizos.

Dada la influencia demostrada de los agentes anestésicos en el MEC (Horn y Klein 2010, Kiewert y col. 2010), el empleo de diversos protocolos anestésicos y diferentes tiempos de extracción de LCR por parte de Witsberger y col. (2012) y Caines y col. (2013) pueden haber influido en los niveles medios más altos de lactato. En nuestro estudio empleamos un protocolo anestésico a base de medetomidina, butorfanol, propofol e isoflurano, mientras que en el estudio de Witsberger y col. (2012) desconocemos la premedicación empleada. Los autores usaron propofol como inductor y sevoflurano o isoflurano durante el mantenimiento. En el estudio de Caines y col. (2013) se emplearon acepromacina e hidromorfona como premedicación (aunque en algunos perros no se especificaba la premedicación utilizada), atracurio como bloqueante neuromuscular, propofol o tiopental como inductores e isoflurano para el mantenimiento. Consecuentemente, el empleo de protocolos anestésicos tan diferentes entre sí, hace que sea imposible la comparación entre estos tres estudios.

Yin y col. (2002), en su estudio sobre hemorragia intracraneal inducida en perros, obtuvieron medianas de lactato en CM de 1,51 mM/L en el momento previo a la hemorragia. Pugliese y col. (2005), en el grupo control hallaron valores basales de lactato de 1,9 mM/L (con una desviación estándar de 0,61 mM/L). Estos valores, considerablemente más altos que los obtenidos en nuestro estudio o los obtenidos en Witsberger y col. (2012), pueden justificarse por el empleo de tiopental como agente anestésico en ambos trabajos. Sonnay y col. (2017) realizaron un estudio sobre los efectos del tiopental en el MEC en ratas. El tiopental reduce el metabolismo oxidativo tanto de neuronas como de astrocitos, disminuyendo la utilización de glucosa como sustrato energético. De este modo, las mediciones realizadas *in vivo* por Sonnay y col. (2017) mostraron la necesidad de las neuronas de obtener una fuente de carbono alternativa a la glucosa, como podría ser el lactato.

El lactato ha sido ampliamente estudiado en la enfermedad de Alzheimer en medicina humana y en el SDCC en el perro. Pugliese y col. (2005) obtuvieron valores de lactato en LCR en CM de 1,9 mM/L en el grupo control. En su estudio se observó un aumento de los valores de lactato en los sujetos con mayores déficits cognitivos, siendo el grupo más afectado el que presentó valores medios de lactato más altos, de  $3,05 \pm 0,92$  mM/L. Con respecto a los valores obtenidos en nuestro estudio (1,18 mM/L), sus valores basales son claramente más altos. Este hecho podría justificarse por un lado por el empleo de agentes anestésicos que deprimen el metabolismo oxidativo mitocondrial a nivel neuronal como el tiopental o anestésicos volátiles (Muravchick y Levy 2006, Sonnay y col. 2017). Por otro lado, estas diferencias se pueden justificar por los animales incluidos en el grupo control. Nosotros empleamos animales sanos mientras que Pugliese y col. (2005) utilizaron como grupo control a perros de entre 1 y 7 años de vida que habían sido atendidos por otras patologías (artritis, axonopatías, neuropatías periféricas o enfermedad discal lumbar, entre otras). Las axonopatías son una condición patológica que contribuye a las manifestaciones clínicas de las enfermedades neurodegenerativas. Uno de los procesos implicados en el desarrollo de las axonopatías son los defectos mitocondriales en el metabolismo oxidativo, lo que conlleva el aumento de los niveles de lactato (Burgess y Chrish 2018). Rojas y col. (2019) describieron el aumento de L-lactato en tejido nervioso periférico asociado a neuropatía diabética en ratas. La disfunción mitocondrial generada por la hiperglucemia mantenida provoca un cambio en la mitocondria desde el metabolismo oxidativo al metabolismo anaerobio. Los niveles de lactato en LCR son independientes de los niveles en plasma; no obstante, en situaciones de hipoglucorraquia o hiperlactatemia, el lactato puede atravesar la BHE por transporte activo dependiente de ATP (Smith y col. 2003). Aunque Pugliese y col. (2005) no tomaron mediciones de lactato en sangre, el empleo de tiopental y anestésicos volátiles, unido a un posible aumento de la concentración de lactato en sangre, justifica que los niveles basales obtenidos fueran mayores a los de nuestro estudio.

Horn y Klein (2010) observaron que los anestésicos volátiles, en comparación con los anestésicos intravenosos, causaban un aumento dosis-dependiente de los niveles extracelulares de lactato y piruvato en el cerebro de ratones de experimentación. En nuestro estudio, a pesar del empleo de isoflurano en el mantenimiento anestésico, los valores de lactato y piruvato han sido más bajos que en los estudios anteriores, en los

que empleaban anestésicos intravenosos como pentobarbital (Sugi y col. 1975) o como tiopental y anestésicos volátiles (Pugliese y col. 2005). Estos datos sugieren que el protocolo anestésico y los tiempos de intubación/extubación pueden interferir en los niveles de lactato y piruvato en LCR. La estandarización de técnicas resulta necesaria para establecer concentraciones fisiológicas de lactato y piruvato en el LCR de perros sanos.

A conocimiento del autor, el rango de referencia del lactato en LCR en el perro no ha sido establecido mediante estudios poblacionales con un elevado tamaño muestral ni se han llevado a cabo estudios elaborados bajo condiciones controladas. Recientemente, Kopanke y col. (2018) publicaron rangos de referencia para la enzima LDH (6-19,3 U/L) utilizando para ello 40 perros, pero no aportaron valores de lactato. Los rangos establecidos para el lactato en LCR están elaborados a partir de estudios clínicos con grupos control muy heterogéneos. En el estudio de Caines y col. (2013) se obtiene un grupo control de 49 perros a partir de 10 perros sanos que se sometieron a RM por razones no neurológicas y otros 39 perros que fueron sometidos a esterilización. En el trabajo de Pugliese y col. (2005) el grupo control se elaboró con 11 perros jóvenes (de 1 a 7 años) sin signos de SDCC pero con diversas patologías. En el estudio de Sullivan y col. (2009) se establece un grupo control de 55 perros con enfermedad discal intervertebral con un amplio rango de lactato en LCR (0,5-7,4 mM/L). La heterogeneidad de las muestras en las que se basan los estudios publicados para elaborar el grupo control, junto a los diferentes protocolos anestésicos empleados, dificultan la obtención de valores de referencia. Esto no ocurre en medicina humana, ya que los estudios para la obtención de valores basales son estudios multicéntricos que incluyen miles de muestras. Leen y col. (2012) establecieron el rango de glucosa y lactato en LCR en personas en función de la edad, empleando para ello 23.618 muestras de LCR obtenidas entre septiembre de 1993 y diciembre de 2008. Tras descartar las muestras que no cumplían con sus criterios de inclusión, finalmente elaboraron el rango de referencia a partir de 4.173 muestras, tamaño muy por encima de lo que habitualmente se consigue en medicina veterinaria. Consecuentemente, mediante estudios multicéntricos se podrían obtener resultados con una gran relevancia en medicina veterinaria. Sin embargo, la menor disponibilidad de financiación para la investigación en animales de compañía hace más difícil llevar a cabo este tipo de estudios.

En nuestro estudio, el valor medio de piruvato es de 0,057 mM/L (0,01-0,15 mM/L) y el ratio L/P 44,24 (6,11-161). Nuestros valores de piruvato son similares a los obtenidos por Löbert y col. (2003) (0,028-0,083 mM/L) en 4 animales sanos previamente a la realización de ejercicio. Pugliese y col. (2005) obtuvieron valores mayores en el grupo control (0,19±0,07 mM/L). En el estudio de Sugi y col. (1975), en 3 animales empleados como control, se encontraron valores de piruvato muy superiores a los nuestros, con valores mínimos de 0,257 mM/L y máximos de 0,32 mM/L. Al igual que ocurre con el lactato, los estudios sobre rangos fisiológicos de piruvato en LCR en medicina veterinaria son muy limitados. En el estudio de Vámosi y col. (1982) se obtuvo el primer rango de referencia de los valores de piruvato en LCR en personas empleando para ello 144 muestras de LCR. En su estudio se estableció un valor medio de 0,10 mM/L con un rango de 0,05-0,15 mM/L. Zhang y Natowicz (2013) determinaron el rango de piruvato en LCR en personas tomando muestras de 627 pacientes, obteniendo un valor medio de 0,1 mM/L (0,03-0,15 mM/L) y un ratio L/P de 13,9 (9,05-26,37). Al igual que en Zhang y Natowicz (2013), en nuestro estudio no observamos diferencias relacionadas con el sexo.

Parnetti y col. (1995) hallaron niveles muy altos de piruvato en pacientes con enfermedad de Alzheimer con mayores déficits cognitivos (1,1 mM/L), mientras que el valor basal medio en el grupo control se estableció en 0,26 mM/L. En el estudio llevado a cabo por Pugliese y col. (2005) se obtuvieron los mayores valores de piruvato en los perros con déficits cognitivos severos (0,29 mM/L), observando mayores niveles de piruvato que en el grupo control (0,19 mM/L) y que en el grupo con ligeros déficits (0,23 mM/L). Al disminuir el metabolismo oxidativo tanto en pacientes con Alzheimer como en perros con SDCC, los astrocitos generan lactato y piruvato como fuentes de energía. Yin y col. (2002) mostraron que el piruvato aumenta en hemorragia subaracnoidea inducida en perros, tal y como Li y col. (2018) observaron en humanos. El aumento de piruvato es considerado por Li y col. (2018) como biomarcador pronóstico negativo en hemorragia subaracnoidea. El hallazgo de valores de piruvato altos en los estudios previos se puede justificar por un metabolismo oxidativo alterado, ya sea por el acúmulo de placas beta-amiloide en SDCC (Pugliese y col. 2005) o por la hemorragia intracraneal y la consecuente disminución del flujo sanguíneo cerebral (Yin y col. 2002, Li y col. 2018). Según nuestros resultados y su proximidad con estudios basales como el de Vámosi y col. (1982) podemos considerar nuestros valores de

piruvato en LCR como normales, dada la ausencia de enfermedades en la evaluación previa de cada sujeto a estudio.

En los estudios de Benoist y col. (2003) y Leen y col. (2012) se describieron valores de piruvato que disminuían con la edad, mientras que el lactato y ratio L/P aumentaban. Sin embargo, estudios como el de Zhang y Natowicz (2013) mostraron que el piruvato aumentaba con la edad. En nuestro estudio no observamos relación significativa entre niveles de piruvato, lactato o ratio L/P. El estrecho rango de edad, de 5 a 7 años, justifica que no se observen diferencias significativas en función de la edad. Resulta necesario realizar estudios estandarizados en medicina veterinaria, con un amplio tamaño muestral, incluyendo variables como la edad, para determinar el verdadero efecto del envejecimiento en las variaciones de lactato, piruvato y ratio L/P en LCR.

En nuestro estudio se obtuvo un valor medio para el ratio L/P en LCR de 44,24, muy superior al ratio obtenido por Sugi y col. (1975), que consiguen un valor de 6,23 o por Pugliese y col. (2005) que obtiene un resultado de 10. La mediana en nuestro estudio es de 20,33. La principal diferencia radica en los valores de piruvato, considerablemente más bajos en nuestro estudio (solo 3/18 muestras presentan valores por encima de 0,1 mM/L, con valor máximo de 0,151 mM/L). Mientras que Sugi y col. (1975) obtuvieron valores medios de piruvato de 0,327 mM/L, nuestro valor medio es de 0,057 mM/L.

El ratio L/P es considerado un marcador del estado de óxido-reducción celular. Los niveles de piruvato disminuyen cuando aumenta la demanda de lactato como sustrato energético, ya que el piruvato es utilizado por la LDH para convertir el piruvato citosólico en L-lactato (Benoist y col. 2003). En nuestro estudio, el ratio L/P presenta un rango de 6,11 a 161, con media de 44,247 y mediana de 20,332. Los sujetos con ratio L/P más altos (161 - 128,18 - 105,38) presentan valores de lactato normales (1,61 - 1,41 - 1,37 mM/L, respectivamente) con valores de piruvato muy bajos (0,01 - 0,011 - 0,013 mM/L, respectivamente). Al igual que en Miyazaki y col. (1998), los sujetos que presentaron ratio L/P elevado, con valores normales de lactato y piruvato en LCR, fueron considerados normales. Esto se debe a la ausencia de estudios que evalúen las alteraciones del metabolismo del piruvato en este sentido (i.e. alteraciones metabólicas hacia la disminución de producción de piruvato). Las alteraciones conocidas en el

metabolismo del piruvato, derivadas principalmente de las alteraciones de las enzimas PK, LDH, ALT y transportadores mitocondriales, producen la elevación de los niveles de piruvato ya que éste no puede ser empleado para producir energía. Solo en el caso de las alteraciones de la PK se van a producir disminuciones en los niveles de piruvato, sobre todo en células que carecen de mitocondria, como los eritrocitos. En este caso, el piruvato disminuirá solo en el eritrocito, pero los niveles sistémicos de piruvato se mantendrán normales (Gray y Tompkins 2014). Los niveles de piruvato en sangre pueden verse afectados por el ejercicio físico intenso y extenuante. Cuando la fosforilación oxidativa resulta insuficiente para mantener la alta demanda de energía en el músculo, el piruvato es transformado en lactato por la LDH para producir energía, disminuyendo las reservas de piruvato de forma transitoria (Travassos y col. 2018). En nuestro estudio, ninguno de los sujetos fue sometido a ejercicio físico previo a la extracción de LCR, mientras que los niveles medios de lactato (1,809 mM/L) y piruvato (0,162 mM/L) en sangre se mantuvieron dentro de los rangos de referencia.

El ratio L/P en sangre (11,16) quedó muy por debajo del obtenido en LCR (44,247). Esto demuestra que a pesar de que los valores de lactato son más altos en suero que en LCR (como consecuencia de la permeabilidad selectiva de la BHE al lactato), el elevado ratio L/P en LCR es consecuencia de los bajos valores de piruvato obtenidos en nuestro estudio con respecto a trabajos previos. Aunque en medicina humana se han establecido los valores de lactato, piruvato y su ratio en LCR [Vámosi y col. 1982, Leen y col. 2012, Zhang y Natowicz (2013)], a conocimiento del autor, no hay artículos que determinen el rango fisiológico del ratio L/P en LCR en el perro. Nuestros datos han sido obtenidos de animales sanos, sin alteraciones en las analíticas previas al estudio, sin enfermedades diagnosticadas y bajo condiciones de anestesia controladas que aseguran la correcta oxigenación del paciente en todo momento. Por lo tanto, habiendo descartado que el ratio L/P elevado se deba a procesos de hipoxia o isquemia cerebral, hay que considerar que es posible que el ratio L/P en el perro de raza Beagle sea más elevado (44,24) que el publicado en estudios de medicina humana.

Entre los factores técnicos que pueden afectar a la concentración de lactato y piruvato en LCR, encontramos la conservación de las muestras y la posible contaminación con eritrocitos. La concentración de lactato en LCR parece no afectarse por la conservación en frío (Löbert y col. 2003). No obstante, en estudios previos (Pugliese y col. 2005, Mariani y col. 2019), se emplean tubos crioprotectores para llevar

a cabo la congelación de las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$  inmediatamente después de la obtención. Recientemente, Nye y Mariani (2018), han desarrollado un medidor portátil de lactato en LCR en el perro con el objetivo de evitar las variaciones de lactato en función del método y tiempo de conservación. En su estudio se valida el lactatómetro tomando mediciones en muestras de LCR en fresco, a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los autores concluyen que, aunque se recomienden las mediciones de lactato en fresco para evitar el deterioro de la muestra, las mediciones llevadas a cabo en congelación sufren solo pequeñas variaciones que pueden ser aceptables. En nuestro estudio, las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 5 días. Los glóbulos rojos en LCR pueden causar un incremento significativo de la concentración de lactato (Venkatesh y col. 2003). Si la presencia de eritrocitos en LCR no forma parte de un proceso patológico, normalmente la contaminación con glóbulos rojos será iatrogénica (Di Terlizzi y Platt 2009). Esta contaminación de las muestras se relaciona con el aumento significativo de los niveles de lactato, por lo que las muestras con valores superiores a 200 eritrocitos/ $\mu\text{l}$  o con un recuento desconocido deben ser excluidas de los estudios por la elevada probabilidad de sobreexpresión de lactato (Leen y col. 2012). En nuestro estudio, todas las muestras fueron de color claro y transparentes, con recuentos de glóbulos rojos por debajo de 200 eritrocitos/ $\mu\text{l}$ .

## ESTUDIO 2

Galán A, Carletti BE, Morgaz J, Granados MM, Mesa I, Navarrete R, Lombardo R, Martínez CM, Martín-Suárez EM. (2014) Comparative study of select biochemical markers in cerebrospinal fluid of healthy dogs before and after treatment with nutraceuticals. *Vet Clin Pathol* 43(1), 72-77.

El declive de las funciones cognitivas asociadas a la edad, tanto en personas como en perros, puede ser ralentizado mediante el empleo de suplementos nutricionales o modificaciones en la dieta (Heath 2007, Head 2011). Se han empleado antioxidantes, vitaminas, ácidos grasos de cadena larga y diferentes NCs pero el efecto real de este tipo de suplementación en el MEC es poco conocido. En el estudio de Heath y col. (2007) se sometieron a un tratamiento de 42 días de duración con nutraceutico (Aktivait®) a un grupo de perros con SDCC. Mediante la realización de test cognitivos observaron una clara mejoría de la sintomatología; sin embargo, no realizaron ningún tipo de medición analítica con valor objetivo. En nuestro estudio, llevamos a cabo un tratamiento con Aktivait® de 50 días, midiendo diferentes parámetros tanto en LCR (PT, RCN, RGR, glucosa, lactato, piruvato, ratio L/P, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>), como en sangre (hemograma, bioquímica sérica (incluyendo ALT, ALP, urea, creatinina y PT) y Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>).

En nuestro estudio, los valores en LCR de glucosa, lactato, piruvato y electrolitos se mantuvieron dentro de los rangos de referencia durante todo el estudio (Benoist y col. 2003, Pugliese y col. 2005, Di Terlizzi y Platt 2006). No obstante, los valores de glucosa y Na<sup>+</sup> mostraron un aumento estadísticamente significativo tras el tratamiento con Aktivait®, pasando de 59 mg/dL a 73 mg/dL en el caso de la glucosa (P = 0,009) y de 151 mM/L a 160 mM/L en el caso del Na<sup>+</sup> (P = 0,026).

El Na<sup>+</sup> es el electrolito más abundante en el LCR y el mayor constituyente de la osmolaridad. Guarda una correlación directa con su concentración en plasma (Di Terlizzi y Platt 2006, Damkier y col. 2013). La concentración de Na<sup>+</sup> en LCR depende de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa, el cotransportador Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y la ruta paracelular (Hladky y Barrand 2016). La bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa es la encargada de mantener el potencial de membrana y esta función consume algo más del 50% de la energía generada en el SNC. Por consiguiente, cualquier patología que afecte tanto a los niveles

de  $\text{Na}^+$  por un lado, como al metabolismo energético por otro, generará desórdenes neurológicos de diversa índole (Klein y Cunningham 2013).

En el estudio de Pugliese y col. (2005) se obtuvieron niveles de  $\text{Na}^+$  similares en los 3 grupos (154,60 - 153,56 - 153,80 mM/L), frente a los 151 mM/L obtenidos en nuestro estudio antes del Aktivait® y los 160 mM/L tras el Aktivait®. La alteración en los niveles de glucosa, lactato, piruvato y glutamato se relacionan con la aparición y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en personas (Parnetti y col. 1995, Leen y col. 2012, Liguori y col. 2015, Ribeiro y col. 2017). La formación de placas  $\beta$ -amiloide y los enredos proteicos de neurofilamentos conllevan la alteración del correcto funcionamiento mitocondrial y homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$ , desencadenando en la muerte celular (Guglielmotto y col. 2010). En el estudio de Pugliese y col. (2005) se observó el aumento de los niveles de lactato (3,05 mM/L) y piruvato (0,29 mM/L) en el grupo con déficits cognitivos severos, el aumento no significativo de los niveles de glucosa (80,71 mg/dL) y el aumento significativo de los niveles de  $\text{K}^+$  (3,24 mM/L). Estos datos en el grupo cognitivamente más afectado implican que hay una reducción del metabolismo oxidativo de la glucosa y un consecuente aumento del metabolismo anaeróbico para producir lactato y piruvato como fuentes de energía. El aumento de los niveles de  $\text{K}^+$  en LCR se explica por el defecto de la bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ , que al no presentar energía suficiente, no realiza el intercambio  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  dependiente de ATP, con el consecuente acúmulo de  $\text{K}^+$  extracelular. En nuestro estudio observamos un aumento significativo de los niveles de  $\text{Na}^+$  sin cambios reseñables en los niveles de  $\text{K}^+$ . La suplementación con DHA y EPA, presentes en el Aktivait®, se ha relacionado con la normalización de la incorporación de ácidos grasos en las membranas fosfolipídicas y con la restauración parcial de la actividad de la bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$  en diferentes regiones del encéfalo en ratas (Kumosani y Moselhy 2011). Por lo tanto, no se puede descartar una acción directa del Aktivait® en la mejora de la funcionalidad de la bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ .

En nuestro estudio se observa cómo los niveles de  $\text{Na}^+$  aumentan tanto en LCR como en suero (de 141 a 149 mM/L) tras 50 días de tratamiento con Aktivait®. Los niveles de  $\text{Cl}^-$  en suero también aumentan de forma significativa y, aunque en LCR no, sí que se observa una tendencia al alza. En base a que los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  se relacionan directamente con el estado de hidratación, los cambios en la ingesta o pérdida de fluidos pueden haber afectado a los niveles plasmáticos y a los niveles en LCR de ambos electrolitos. Aunque la concentración de proteínas séricas no

experimentó cambios tras el tratamiento, sí que hay una ligera elevación del hematocrito [sin significancia estadística ( $P = 0,273$ )], por lo que una ligera deshidratación puede haber afectado a estos valores. El tiempo de privación de agua antes de la anestesia fue similar en ambas ocasiones. No obstante, las diferencias de temperatura ambiental (de 14-20°C en la primera anestesia frente a 19-24°C en la segunda) pueden ser la causa de esa ligera deshidratación.

La glucosa llega al LCR por difusión o transporte facilitado desde la sangre. Su concentración en LCR es de aproximadamente el 60-80% de la glucosa en sangre por lo que los niveles fisiológicos de glucosa en LCR van a depender directamente de la glucemia, del ratio metabólico cerebral y del grado de saturación de los transportadores de glucosa (Di Terlizzi y Platt 2006. Jaggy 2010). En este estudio, apreciamos un aumento significativo de la concentración de glucosa en LCR tras el tratamiento con Aktivait®, pero no se observan cambios en los niveles de glucosa en sangre. Antes de iniciar el tratamiento, la glucosa en LCR representaba el 75,6% de la glucemia, el cual está dentro del rango fisiológico descrito (60-80%). Tras el tratamiento, la glucorraquia sube hasta el 83,9% del valor de glucosa en sangre. Atendiendo a estos valores, podemos decir que el aumento significativo de glucosa en LCR no se debe en exclusiva al aumento de la glucosa en sangre. En situaciones de hipoglucemia, la glucosa pasará rápidamente a LCR, mientras que en casos de hiperglucemia, los transportadores se saturan y limitan la entrada de glucosa a través de la BHE (Di Terlizzi y Platt 2006). El aumento o disminución del consumo de glucosa por el tejido neuronal influye de forma directa en los niveles de glucorraquia. Los procesos inflamatorios, infecciosos o crisis convulsivas desencadenan un mayor consumo de glucosa y por lo tanto, una reducción en sus niveles en LCR. Por otro lado, la hipotermia severa, el estado comatoso o los agentes anestésicos pueden actuar disminuyendo el metabolismo cerebral, reduciendo el consumo de glucosa y provocando su aumento en LCR (Jaggy 2010). Todos los animales incluidos en el estudio eran animales sanos, sin ninguna patología detectada en el examen pre-anestésico. Aunque las muestras fueron obtenidas bajo las mismas condiciones anestésicas, tanto antes como después del tratamiento, el propofol e isoflurano pueden haber contribuido al aumento de los niveles de glucosa en LCR al disminuir el ratio metabólico cerebral (Miller 2015). No obstante, el aumento de la glucorraquia tras el tratamiento puede guardar relación con una mejora en el MEC como consecuencia de la suplementación con NC. Los componentes del Aktivait®, vitaminas,

PUFA, NAC y CoQ10 entre otros, contribuyen a mejorar la estabilidad de las membranas neuronales y la actividad de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  (Heath y col. 2007, Martin y col. 2011, Dahms y col. 2016, Sarmiento y col. 2016, Weiser y col. 2016). La mejora en el metabolismo oxidativo neuronal provoca la reducción en la captación de glucosa por los astrocitos para producir lactato (Pugliese y col. 2005). De esta manera, hay una mayor biodisponibilidad de la glucosa para ser captada por las neuronas con el objetivo de producir energía.

El lactato ha sido considerado como un marcador de hipoxia tisular y como un factor pronóstico negativo cuando sus valores plasmáticos suben por encima de 6 mM/L (Silverstein y Hopper 2015). Actualmente, se le adjudica un efecto neuroprotector a nivel del SNC (Pugliese y col. 2005). En condiciones patológicas, en las que se produce una liberación masiva de glutamato, despolarización generalizada y excitotoxicidad mediada por el exceso de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, se produce una adaptación de las rutas metabólicas. Por un lado, se inhibe la enzima glutaminasa y por otro lado, se activa la LDH para producir lactato con el que se pueda producir energía por parte de las neuronas. Por esta razón, el lactato en situaciones de alta demanda energética neuronal se considera neuroprotector al permitir el funcionamiento de todo el tejido nervioso (Loaiza y col. 2003, Gladden 2004). La disminución significativa del lactato ( $P = 0,016$ ) junto con el aumento de los niveles de glucosa ( $P = 0,009$ ) en LCR y el aumento no significativo ( $P = 0,6$ ) del lactato en sangre tras el tratamiento con Aktivait® pueden reflejar la presencia y mejora de un metabolismo cerebral oxidativo. Ya que las concentraciones de lactato en LCR son independientes a las del plasma (el lactato en pH fisiológico se encuentra en su forma ionizada y no atraviesa la BHE) y dependen directamente de su ratio de producción en tejido nervioso (Pang y Boysen 2007), la reducción de la producción de lactato como fuente de energía y el aumento de la disponibilidad de la glucosa en LCR reflejan la mejora en el metabolismo oxidativo neuronal tras la administración de NC.

El ratio L/P refleja de forma real el estado oxidativo del encéfalo y es considerado un biomarcador citosólico del estado de óxido-reducción ( $\text{NADH/NAD}^+$ ) (Benoist y col. 2003). Existe una fuerte correlación en el metabolismo de la glucosa, lactato y piruvato, de manera que en estados de hipoglucemia, el lactato tiende a aumentar y el piruvato a disminuir. Debido a ello, el ratio L/P se hace mayor cuanto mayor sea la diferencia entre lactato y piruvato. El ratio L/P es considerado un marcador

de hipoxia y glucólisis anaerobia (Day y col. 2000). En el estudio de Day y col. (2000) se encontraron valores de ratio L/P en sangre venosa significativamente más altos en los pacientes contagiados de malaria con peor pronóstico. Jacobson y Lobetti (2005) observaron resultados parecidos en perros con babesiosis, siendo peor el desenlace en los pacientes que presentaron niveles más bajos de glucemia (2 mM/L) y ratios L/P en sangre más altos ( $31,7 \pm 14,6$ ). Nuestro estudio muestra resultados similares, observando el valor medio del ratio L/P en LCR más alto (16,2) antes del tratamiento, con valores de glucosa de 59 mg/dl. Tras el tratamiento, el ratio L/P baja a 9,9 ( $P = 0,05$ ) y la glucosa sube a 73 mg/dl, sugiriendo de esta manera la mejora en el metabolismo oxidativo cerebral tras el empleo de NC. En el estudio de Sugi y col. (1975) se observó cómo el lactato aumentaba y el piruvato disminuía progresivamente en LCR tras varias horas de la inducción de hemorragia cerebral. En consecuencia, el ratio L/P en LCR aumentó de forma progresiva evidenciando el estado anaeróbico presente en el encéfalo. En el estudio de Pugliese y col. (2005) obtuvieron ratios L/P en LCR muy similares en los 3 grupos de estudio. A conocimiento del autor, el rango de referencia para el ratio L/P en LCR no ha sido establecido en base a estudios poblacionales. Los valores de referencia para el ratio L/P en LCR que disponemos han sido obtenidos de estudios clínicos con escaso número de pacientes y en base a grupos de estudio con diversas patologías (Sugi y col. 1975, Pugliese y col. 2005). Otros trabajos aportan valores de referencia para el ratio L/P en sangre venosa (Day y col. 2000, Jacobson y Lobetti 2005). Resulta necesario realizar más estudios basales en medicina veterinaria para poder establecer los niveles fisiológicos de lactato, piruvato y ratio L/P en el perro.

La concentración sérica de creatinina en nuestro estudio (1 mg/dl antes del tratamiento y 0,6 mg/dl tras el tratamiento) disminuyó significativamente ( $P = 0,007$ ) tras la suplementación con Aktivait®. Nuestros datos concuerdan con los obtenidos en el estudio en medicina humana de Lauretani y col. (2009), en el que se observó la disminución de creatinina sérica en pacientes con un suplemento de PUFA en su dieta. La suplementación con este tipo de ácidos grasos retrasa el avance de la enfermedad renal crónica gracias a los efectos antiinflamatorios que presentan, reduciendo el óxido nítrico, el FNT- $\alpha$  y la proteína quinasa (Lauretani y col. 2009). La mejora en la función renal es también analizada por Hall y col. (2015). En este estudio observan que los perros con dietas suplementadas con lípidos funcionales (aceites de pescado), ácido lipoico, carnitina y mayores cantidades de frutas y verduras (ricas en antioxidantes y

vitaminas), mejoraron su tasa de filtración glomerular, retrasando el avance de la enfermedad renal crónica. Por lo tanto, la disminución significativa de los niveles de creatinina en nuestro estudio pueden estar relacionados con los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de los componentes del Aktivait®.

## ESTUDIO 3

Seisedos A, Galán A, Carletti B, Quirós S, Funes F, Martín EM, Domínguez JM, Gómez R, Granados MM. (2019) Anesthetic effects of isoflurane and propofol on cerebrospinal fluid biochemical markers in healthy dogs. *Vet Clin Pathol* 48(2), 270-275.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran la fluctuación sufrida por los niveles de lactato en LCR, tanto en función del agente anestésico empleado, como en relación al tiempo de extracción de la muestra. A los 15 minutos de la inducción anestésica (T0) no se observan fluctuaciones en los niveles de lactato, ni en el grupo anestesiado con propofol (1,4 mM/L), ni en el anestesiado con isofluorano (1,43 mM/L). No obstante, a las 3 horas de la inducción anestésica (T3), podemos observar una disminución significativa de los niveles de lactato en el grupo-Propo (1,02 mM/L), mientras que por otro lado, observamos una tendencia a aumentar en los niveles de lactato en el grupo-Iso (1,58 mM/L). Resultados similares obtuvieron Horn y Klein (2010) en su estudio de microdiálisis en ratas. En su estudio se hallaron niveles de lactato más altos tanto en LCR como en cortes histológicos de encéfalo *in vitro* al exponerlos a isofluorano. El aumento fue dosis-dependiente, obteniendo valores significativamente más altos en los sujetos con un Et del 2% en comparación con los del Et al 1%. Los anestésicos volátiles provocan un aumento dosis-dependiente de los niveles de lactato en LCR en perros, mientras que los anestésicos inyectables no provocan variaciones (Sobbeler y col. 2018). En nuestro estudio mantenemos un Et del 1,3-1,5%, lo que puede justificar que no hayamos obtenido una mayor diferencia en los niveles de lactato en LCR tras la exposición al isofluorano, en comparación con los resultados obtenidos por Horn y Klein (2010).

Actualmente, todavía se desconoce el mecanismo por el cual el isofluorano, y otros agentes anestésicos volátiles, provocan la elevación de los niveles de lactato. La hipoxia cerebral cursa con la elevación de los niveles de lactato y glutamato en LCR y una disminución drástica de la glucosa (Kiewert y col. 2010). Sin embargo, los valores medios de saturación arterial de oxígeno obtenidos en el grupo-Iso (T0: 99,6 y T3: 99,7), de glucosa (T0: 104 mg/dL y T3: 105 mg/dL) y de glutamato (T0: 8,89 mM/L y

T3: 11,20 mM/L) no reflejan periodos de hipoxia durante la anestesia, por lo que la hipoxia tisular no parece justificar la elevación de los niveles de lactato en LCR encontrados en nuestro trabajo. Los estudios llevados a cabo en las dos últimas décadas (Muravchik y Levy 2006, Horn y Klein 2010, Sobbeler y col. 2018, Demine y col. 2019, Nicholatos y col. 2019) ponen de manifiesto el efecto de los anestésicos volátiles en la producción intratecal de lactato, deprimiendo la respiración mitocondrial y promoviendo el desacople mitocondrial. Estos mecanismos, en condiciones controladas, pueden actuar de forma neuroprotectora frente a la excesiva producción de RL.

Muravchick y Levy (2006), en su revisión sobre las implicaciones clínicas de la disfunción mitocondrial, describieron que el propofol disminuye el consumo de oxígeno y la producción de ATP en los sinaptosomas encefálicos. El propofol inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, evitando el transporte de electrones para la producción de ATP. En relación a este concepto, el propofol es considerado por tanto un agente neuroprotector, disminuyendo el metabolismo oxidativo a nivel neuronal, reduciendo la formación de RL y por lo tanto, promoviendo la formación de ATP a partir del lactato. En el estudio de Sobbeler y col. (2018), los datos mostraron que los anestésicos inyectables no interfieren en la formación de lactato. Sin embargo, nuestros datos reflejan una reducción significativa de los niveles de lactato en el grupo-Propo a las 3 horas de la inducción anestésica, mientras que no existen variaciones en T0 entre grupos. Estos resultados sugieren que las variaciones de determinados biomarcadores del MEC no son solo dosis-dependientes (como demuestran estudios previos como los de Horn y Klein 2010 o Sobbeler y col. 2018) sino también tiempo-dependientes. Por lo tanto, el momento de extracción de LCR debe ser tenido en cuenta, al igual que el agente anestésico empleado.

Los niveles de lactato que hemos obtenido en plasma en el grupo-Iso son más elevados en comparación con los niveles en LCR, tanto en T0 (2,04 mM/L en plasma frente a 1,43 mM/L en LCR) como en T3 (1,98 mM/L en plasma frente a 1,58 mM/L). Sin embargo, Horn y Klein (2010) encontraron niveles de lactato en LCR al menos dos veces más altos que en sangre. No ocurre lo mismo con los niveles de lactato encontrados en nuestro estudio en el grupo-Propo, donde los valores medios son muy similares en plasma y LCR tanto en T0 (1,36 mM/L en plasma frente a 1,40 mM/L) como en T3 (1,16 mM/L en plasma frente a 1,02 mM/L). Nuestros datos en el grupo-Propo reflejan similitudes con los estudios de Caines y col. (2013) y Sobbeler y col.

(2018), donde no se encontraron cambios significativos en el lactato en LCR frente al valor plasmático. En sus estudios, emplean protocolos anestésicos diferentes en cada grupo, lo que dificulta el poder establecer un nivel de correlación significativo entre los datos. No obstante, los sujetos que fueron anestesiados con isoflurano, mantuvieron un Et todavía más bajo que en nuestro estudio (0,66-1,17%), por lo que la elevación del lactato en LCR como consecuencia de la exposición a isoflurano fue limitada. En el estudio de Caines y col. (2013) además utilizaron varios tiempos de extracción de LCR en función del grupo. El momento de extracción varió entre los 15 minutos post-inducción en el grupo de cirugía y las  $2,5 \pm 0,45$  h en el grupo de perros sanos. Como podemos observar en nuestro estudio, el momento de extracción de LCR influye en la concentración de lactato, por lo que los datos aportados por Caines y col. (2013) deben ser interpretados con cautela. En el trabajo de Witsberger y col. (2012), al igual que en nuestro estudio, obtuvieron valores plasmáticos de lactato (Mediana: 1,6 mM/L, Rango: 0,18-7,59 mM/L) mayores que en LCR (Mediana: 1,32 mM/L, Rango: 0,81-1,99 mM/L). En su estudio incluyeron pacientes con hernia discal intervertebral que ya habían sido sometidos a diferentes tratamientos (corticoides, AINEs y analgésicos) y no detallan el protocolo anestésico empleado. Los autores no consiguieron relacionar los niveles de lactato en LCR con hernia discal, ya que no encontraron diferencias entre el grupo control y el grupo a estudio. Aunque nuestros resultados se asemejan a otros previamente publicados, la diversidad de estudios, patologías estudiadas, protocolos anestésicos empleados y tratamientos utilizados, ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios poblacionales con un elevado tamaño muestral para establecer rangos fisiológicos de lactato y sus variaciones en función del agente anestésico empleado y el momento de extracción.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sobre la concentración de glutamato en LCR se acercan más a los valores fisiológicos encontrados en LCR en personas (Danbolt 2001, Featherstone y Shippy 2008) que a los hallados en otros estudios de medicina veterinaria (Butterwoth y col. 1997, Olby y col. 1999, Pham y col. 2008, Creevy y col. 2013).

En medicina humana, los niveles de glutamato en LCR de personas sanas se ha establecido en torno a  $8 \mu\text{mol/L}$  de media y un rango de  $3\text{-}10 \mu\text{mol/L}$  (Featherstone y Shippy 2008, Cooper y Jeitner 2016). En el trabajo de Creevy y col. (2013) sobre niveles de glutamato y GABA en LCR en perros con epilepsia idiopática (EI), hallaron

niveles de glutamato en el grupo control muy por debajo de los obtenidos en nuestro estudio (1,22  $\mu\text{mol/L}$  en Creevy y col. (2013) frente a 8,89  $\mu\text{mol/L}$  en T0 en el grupo-Iso y 10,7  $\mu\text{mol/L}$  en T0 en el grupo-Propo). Además, los otros dos grupos de su estudio (un grupo con EI sin cambios en la RM y otro grupo con EI con cambios en RM) mostraron niveles de glutamato (6,89  $\mu\text{mol/L}$  y 8,5  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente) cercanos a los de nuestro estudio, pero aún con valores medios más bajos.

Aunque la concentración de glutamato aumenta en las muestras almacenadas a temperatura ambiente (Creevy y col. 2013), nuestras muestras fueron congeladas a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de que transcurrieran 5 minutos de la extracción, por lo que el tiempo que han pasado a temperatura ambiente ha podido tener muy poca relevancia en los niveles de glutamato. En su trabajo, Creevy y col. (2013) mantuvieron las muestras almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y éstas son estables durante al menos 9 meses. No obstante, no se conoce cuánto tiempo permanece estable el glutamato en muestras almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por lo que las diferencias encontradas entre ambos estudios pueden guardar relación con el modo de conservación de las muestras. En su trabajo, de carácter retrospectivo, no especifican el tiempo de almacenamiento de las muestras utilizadas, por lo que no podemos saber si la concentración de glutamato ha podido sufrir alteraciones en muestras que hayan sido almacenadas durante más de 9 meses. Al igual que en el estudio de Creevy y col. (2013), en el trabajo de Butterworth y col. (1997) se registraron valores medios de glutamato en LCR muy inferiores en el grupo control (1,4  $\mu\text{mol/L}$ ) a los obtenidos por nuestro grupo de trabajo. En este estudio, los autores llevaron a cabo el análisis de las muestras de LCR de forma inmediata tras la extracción, por lo que redujeron así el riesgo de aumento de los niveles de glutamato por la conservación de las muestras. En Butterworth y col. (1997), la extracción de LCR se llevó a cabo tras la inducción anestésica, antes de la intervención quirúrgica, mientras que en el estudio de Creevy y col. (2013) no se especificó el momento de extracción al tratarse de un estudio retrospectivo. Los resultados obtenidos en nuestro estudio no muestran diferencias significativas ni en relación al momento de extracción del LCR ni al agente anestésico utilizado.

En el estudio de McEwen y col. (2015) se reflejó la elevación de los niveles de glutamato extracelular en respuesta a momentos de estrés agudo en animales no adrenalectomizados, sugiriendo una fuerte relación entre la liberación de neurotransmisores excitatorios y el mantenimiento de una adecuada capacidad de

respuesta al estrés. Los sujetos empleados en nuestro estudio fueron animales sanos, sin patologías conocidas, por lo que la ausencia de fármacos sedantes en nuestro protocolo anestésico ha podido generar la liberación fisiológica de glutamato en respuesta al estrés del procedimiento. Esto podría justificar los niveles anormalmente altos de glutamato en LCR obtenidos en nuestro estudio en comparación con estudios previos. En consecuencia, dado el elevado número de patologías diferentes en las que se ha evaluado el nivel de glutamato en LCR, resulta necesario realizar estudios más amplios, con criterios unificados, con vistas a esclarecer el rango fisiológico de glutamato en el LCR del perro.

Los valores de piruvato no presentan diferencias significativas ni entre el momento de extracción ni en relación al agente anestésico. Sin embargo, el valor en T0 en el grupo-Propo es 10 veces mayor al valor en T0 en el grupo-Iso, mientras que en T3 el valor se triplica en el grupo-Propo. En ambos grupos se observa una tendencia a aumentar el valor de piruvato con el paso del tiempo. El ratio L/P presenta valores considerablemente más altos en el grupo-Iso (T0: 143; T3: 39,5), frente al grupo-Propo (T0: 14; T3: 8,5). Aunque el ratio L/P es indicativo del estado de óxido-reducción del encéfalo, gracias a la monitorización de los sujetos, podemos afirmar que no sufrieron momentos de hipoxia tisular, por lo que atribuimos la reducción de los valores de piruvato en gran medida al isofluorano. Los valores más bajos de piruvato se obtienen a los 15 minutos de la inducción anestésica con isofluorano, tendiendo a estabilizarse con el paso del tiempo. La inducción con mascarilla, necesaria en animales que no llevan premedicación anestésica, puede suponer un procedimiento estresante en animales sanos sin depresión del estado mental. En el trabajo de Mutoh y col. (2001) se evidenció un aumento significativo de la frecuencia cardíaca y de las presiones arteriales en perros inducidos con mascarilla con isofluorano o sevofluorano durante los primeros minutos. La liberación de glutamato en respuesta al estrés va a propiciar la adaptación de las rutas metabólicas, activando la LDH para producir lactato a partir del piruvato con el objetivo de generar energía en forma de ATP (Loaiza y col. 2003, Gladden 2004, Pugliese y col. 2005) y provocando el desacople mitocondrial para proteger a la neurona del exceso de radicales libres (Nicholatos y col. 2019). La reducción de los niveles de piruvato en el grupo-Iso, junto a la presencia de valores más altos de lactato en el grupo-Iso con respecto al grupo-Propo tanto en T0 como en T3, hace posible que el efecto

neuroprotector del isofluorano en el SNC pueda ser la justificación de los datos obtenidos.

Nuestros datos reflejan valores de piruvato por debajo de los publicados en estudios previos (Sugi y Fujishima 1975, Yin y col. 2001, Pugliese y col. 2005). En los 3 estudios emplean protocolos anestésicos diferentes dado que el objetivo no fue evaluar el efecto de los agentes anestésicos sobre el MEC. En el estudio de Sugi y Fujishima (1975) emplearon pentobarbital y galamina, Yin y col (2001) utilizaron tiopental y Pugliese y col. (2005) anestesiaron a los animales con diacepam y tiopental. Además, emplearon métodos analíticos diferentes, por lo que la comparación de resultados puede inducir a error.

Nuestros datos reflejan aumentos muy marcados de los niveles de glucosa en sangre y LCR tanto en T0 como en T3 en ambos grupos (Tabla 1), en comparación con estudios anteriores (Yin y col. 2002, Pugliese y col. 2005, Leen y col. 2012, Galán y col. 2014). A pesar de ello, los niveles de glucosa no sufren variaciones significativas en función del agente anestésico empleado ni del momento de extracción. Dado que los niveles de glucosa en LCR dependen en gran medida de la glucemia, observamos que el aumento de glucosa en LCR va en concordancia con el aumento en sangre, ya que en 3 de los 4 grupos, ésta se mantiene dentro del 60-80% del valor de glucosa sanguínea. Como podemos apreciar en estudios previos (Horn y Klein 2010), los anestésicos volátiles no provocan variaciones significativas de glucosa en LCR en ratas. En perros, los valores de glucosa en plasma aumentan significativamente con el uso de isofluorano, sevofluorano y alfaxolona, mientras que descienden con el propofol (Sobbeler y col. 2018). Este último estudio obtuvo valores basales de glucosa en sangre de 95,3 mg/dL, aumentando de forma significativa con mayores concentraciones de isofluorano (108,1 mg/dL). Aunque el isofluorano pueda aumentar el nivel de glucemia de forma dosis-dependiente, los valores netamente más altos que obtenemos en nuestro estudio parecen ser debidos al efecto conjunto que puedan ejercer los agentes anestésicos y al hecho de no haber empleado fármacos preanestésicos. La premedicación anestésica es necesaria en pacientes ASA I-III con el objetivo de disminuir la ansiedad, facilitar la inducción anestésica, y para disminuir las dosis de fármacos necesarias para poder intubar al paciente (Dugdale 2010). El cortisol, liberado como respuesta al estrés, activa procesos catabólicos y la movilización de reservas energéticas, provocando la gluconeogénesis, lipólisis y proteólisis (Chmelíková y col. 2019). En el estudio de Kim y col. (2010) se

pone de manifiesto la elevación de los niveles de cortisol en perros salvajes capturados sin emplear ningún sedante frente al grupo en el que emplearon alprazolam, en el que obtienen una disminución significativa de los niveles de cortisol. Aunque no tenemos mediciones de cortisol, el estrés generado por la inducción sin premedicación puede ser la causa de la ligera hiperglucemia observada en nuestro estudio.

Los valores de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{+2}$  iónico en LCR no sufrieron variaciones significativas a lo largo del estudio, ni en relación al agente anestésico empleado ni en función del momento de extracción del LCR. Los niveles de electrolitos en LCR y sangre son ligeramente diferentes, ya que el transporte desde la sangre a LCR y viceversa se produce mediante transportadores dependientes de ATP a nivel de BHE, barrera sangre-LCR y plexos coroideos (Di Terlizzi y Platt 2006, Damkier y col 2013, Silverstein 2015, Hladky y Barrand 2016). Los agentes anestésicos empleados en nuestro estudio no influyen en la homeostasis electrolítica, ya que no alteran la función de las bombas  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ ,  $\text{Ca}^{+2}-\text{ATPasa}$ , ni los canales iónicos transmembrana. El  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ , tanto a nivel sérico como en LCR, dependen en gran medida del estado de hidratación. En nuestro estudio, en base tanto a la exploración preanestésica (frecuencia cardíaca, tiempo de relleno capilar, coloración de las mucosas y pliegue cutáneo) como a los resultados analíticos (tanto el hematocrito como las proteínas totales en todos los animales estaban dentro del rango fisiológico), ninguno de los animales presentó deshidratación y durante la anestesia todos fueron mantenidos con fluidoterapia balanceada (ringer lactato) durante las 3 horas de duración de la anestesia.

Los niveles fisiológicos de  $\text{Ca}^{+2}$  iónico en LCR no han sido bien definidos ni en personas ni en animales. Recientemente, en el trabajo de investigación de Forsberg y col. (2019) se establecieron los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  total en LCR en personas sanas en 1,18 mM/L, mientras que los valores de  $\text{Ca}^{+2}$  iónico fueron ligeramente más bajos (1 mM/L). En nuestro estudio, los valores de  $\text{Ca}^{+2}$  iónico en LCR fueron muy parecidos tanto en el grupo-Iso en T0 (1 mM/L), como en T3 (0,96 mM/L), así como en el grupo-Propo en T0 (0,97 mM/L) y en T3 (0,96 mM/L). No obstante, los valores de  $\text{Ca}^{+2}$  iónico en sangre fueron más bajos (0,73-0,85 mM/L). Según estudios como los de Di Terlizzi y Platt (2006), Damkier y col. (2013) o Forsberg y col. (2019), los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  en LCR son independientes a los del plasma, ya que la BHE y la barrera sangre-LCR regulan de forma activa la entrada y salida de  $\text{Ca}^{+2}$  en el encéfalo. Los resultados obtenidos por nuestro estudio muestran valores de  $\text{Ca}^{+2}$  iónico en LCR superiores a los

del plasma, por lo que una posible justificación puede ser errores en la toma o procesado de las muestras. Los valores de  $\text{Ca}^{+2}$  pueden verse afectados por el tipo de dieta, tiempo de ayuno previo a la extracción de la muestra, edad o momento del día en el que se lleva a cabo la extracción, ya que la regulación del  $\text{Ca}^{+2}$  sigue un ritmo circadiano (Rosol y Capen 1996). La dieta y el tiempo de ayuno fueron iguales para todos los sujetos a estudio; sin embargo, el momento de extracción de las muestras sí osciló entre diferentes horas del día. Estudios como los de López y col. (2005) mostraron cambios en los niveles de hormona paratiroidea y  $\text{Ca}^{+2}$  iónico en función de la hora de extracción de las muestras. Los autores concluyeron que las variaciones observadas en su estudio no deben influir en la interpretación de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  y de hormona paratiroidea para fines diagnósticos. Aún así, recomiendan que la extracción de las muestras se realicen entre las 09:00 y las 12:00 horas para evitar variaciones asociadas al ritmo circadiano. Las modificaciones en el pH sanguíneo como consecuencia de la ingesta de alimento reciente o de la toma de muestra en aerobiosis pueden dar lugar a que una mayor fracción de  $\text{Ca}^{+2}$  iónico se una a proteínas, reduciendo su valor en sangre de forma artefactual (Rosol y Capen 1996, López y col. 2005). En nuestro estudio la toma de muestras se realizó en anaerobiosis y la medición de  $\text{Ca}^{+2}$  iónico se llevó a cabo con la medición del pH y temperatura sanguíneos de esa misma muestra. No obstante, no se pueden descartar errores laboratoriales que justifiquen que los valores de  $\text{Ca}^{+2}$  iónico sean más bajos en sangre que en LCR.

Los niveles más bajos de proteínas en LCR en comparación con la sangre, provocan que la fracción de  $\text{Ca}^{+2}$  unido a proteínas sea más baja en LCR que en plasma. En consecuencia, los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  iónico y/o el  $\text{Ca}^{+2}$  unido a otros solutos aumentan en LCR para completar la suma de  $\text{Ca}^{+2}$  total. No obstante, los valores de referencia todavía no han sido establecidos, pero se estima que el 85% del  $\text{Ca}^{+2}$  total se encuentra en su forma ionizada en LCR (Forsberg y col. 2019).

## ESTUDIO 4

Galán A, Seisdedos A, Carletti BE, Quirós S, Martín EM, Menor D, Granados MM. (2020) Cisternal versus lumbar cerebrospinal fluid lactate concentration in healthy dogs. *Vet Med (Praha)* 65, 297-300.

A conocimiento del autor, no existen estudios clínicos sobre las diferencias en la concentración de lactato en LCR, en condiciones fisiológicas, en función del lugar de extracción (CM o CL) en el perro. Tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, se ha descrito un flujo rostrocaudal de determinados biomarcadores en LCR. En el trabajo de Tarnaris y col. (2011) se describió en personas una tendencia al alza de los niveles de lactato en CL (2,07 mM/L) frente a CM (1,71 mM/L). En medicina veterinaria, los resultados del estudio de Vaughn y col (1988), mostraron en perros una disminución de determinados metabolitos (ácido di-hidroxi-fenil-acético, ácido homovanílico y ácido 5-hidroxiindolacético) en CL con respecto a CM, mientras que los niveles de PT fueron más altos en CL (27,2 mg/dL) que en CM (16,1 mg/dL). En el trabajo de Andrews y col. (1990) se observó en el caballo el aumento de los niveles de lactato en CL con respecto a CM. En un estudio llevado a cabo en perros con enfermedad discal toracolumbar a los que se extrajo LCR tanto de CM como de CL, Olby y col. (1999) pusieron de manifiesto la importancia de extraer LCR caudal a la lesión neurológica, como consecuencia del flujo rostrocaudal del LCR. Los autores obtuvieron valores de glutamato dentro del rango fisiológico en CM pero elevados en CL. En el trabajo de Witsberger y col. (2012) se tomaron muestras de LCR en CM en pacientes con hernia discal toracolumbar para medir lactato, entre otros biomarcadores. Los autores no observaron cambios significativos en los valores de lactato que pudieran ser empleados como factor pronóstico de la evolución. Posiblemente, el hecho de obtener LCR de CM, craneal a la lesión neurológica, ha provocado la ausencia de resultados significativos en el estudio de Witsberger y col. (2012). Por lo tanto, el conocimiento de las concentraciones fisiológicas de los distintos biomarcadores del MEC en CM y CL resulta esencial para la comprensión del significado patológico que puede tener cada biomarcador.

En cuanto a los valores de lactato en CL, nuestro estudio aporta datos relevantes acerca del flujo eminentemente rostro-caudal del lactato en LCR en el SNC en el perro. Los valores medios de lactato en CL fueron de 1,58 mM/L (frente a 1,44 mM/L en CM), siendo significativamente más altos que en CM ( $P < 0.05$ ). Aunque en el perro no se ha establecido la causa por la cual la concentración de PT y otros metabolitos es más alta en CL que en CM, en medicina humana, estudios como los de Fishman y col. (1958) ponen de manifiesto el diferente grado de permeabilidad de las membranas. Las diferentes características del endotelio capilar, de la membrana pial-glial, del epéndimo, de los plexos coroideos y de la membrana aracnoidea hacen que la permeabilidad de estas barreras sea diferente en CM que en CL. La mayor permeabilidad en CL hace que los niveles de proteínas sean mayores que en CM (Fishman y col. 1958), al igual que los niveles de lactato son también mayores en CL (Gerber y col. 1998, Tarnaris y col. 2011).

Como observamos en Seisedos y col. (2019), los valores de lactato obtenidos en T0 no difieren de forma significativa entre el grupo-Propo y el grupo-Iso, obteniendo diferencias significativas sólo en T3, a las 3 horas de la inducción anestésica. Por lo tanto, ni el agente anestésico empleado ni el tiempo utilizado en este estudio para la extracción de LCR (15 minutos post-inducción) podrían haber influido en la determinación de los valores de lactato en CL. Aunque el reducido tamaño muestral de nuestro estudio impide que nuestros resultados puedan ser empleados como valores de referencia para el lactato en LCR en el perro, sí podemos concluir que nuestros valores son similares a los obtenidos en estudios anteriores en medicina humana y en caballos.

Las diferencias encontradas en cuanto a la determinación de biomarcadores del MEC en LCR, en función del lugar de extracción, tanto en nuestro estudio como en estudios previos (Olby y col. 1999, Tarnaris y col. 2011, Witsberger y col. 2012) genera la necesidad de llevar a cabo estudios más amplios para determinar el rango fisiológico de cada metabolito en CM y CL, así como determinar el lugar de extracción en función de la patología.

## CONCLUSIONES

---

Las mediciones de determinados marcadores del MEC en LCR en el perro de raza Beagle van a sufrir modificaciones asociadas a factores como el momento y el punto de extracción de la muestra, el protocolo anestésico utilizado y el tratamiento previo. El veterinario debe conocer los posibles cambios que pueden sufrir los diferentes biomarcadores con el objetivo de evitar errores en el proceso diagnóstico. Por lo tanto, las conclusiones de esta tesis son las siguientes:

1. La determinación de lactato, piruvato y ratio L/P en LCR de 18 perros sanos de raza Beagle nos permite establecer las bases para la elaboración de un rango fisiológico de estos biomarcadores del MEC en cisterna magna. El empleo de un mismo protocolo anestésico en todos los perros y la utilización de la misma cohorte de edad reduce el sesgo de los datos observado en estudios previos.
2. Tras 50 días de tratamiento con nutracéuticos (Aktivait®), los valores de glucosa y sodio en LCR aumentaron de forma significativa, mientras que los niveles de lactato y ratio L/P descendieron. Estos datos sugieren una mejoría en el estado oxidativo del MEC tras el tratamiento en estos perros. Las proteínas totales, recuento celular, cloro, potasio y piruvato permanecieron sin cambios.
3. Tanto el protocolo anestésico como el momento de extracción del LCR influyen en la concentración de biomarcadores del MEC. En T0 no se observaron diferencias significativas; sin embargo, en T3, en el grupo-Propo se observa una disminución significativa de los niveles de lactato, mientras que en el grupo-Iso el lactato tiende a aumentar. La necesidad de anestesiarse a los perros para la extracción de LCR y las diferencias observadas en nuestro estudio condicionan que se deba tener en cuenta las variaciones de biomarcadores del MEC generadas por el agente anestésico empleado.
4. La concentración de lactato en LCR fue mayor en las muestras obtenidas en cisterna lumbar en comparación con las obtenidas en cisterna cerebelomedular en perros de raza Beagle. Estos resultados ponen de manifiesto el flujo eminentemente rostrocaudal del LCR en el SNC en el perro.

## BIBLIOGRAFÍA

---

---

- 1.-Abdelhak A, Hottenrott T, Mayer C, Hintereder G, Zettl UK, Stich O, Tumani H. (2017) CSF profile in primary progressive multiple sclerosis: re-exploring the basics. *PloS One* 12(8), e0182647.
- 2.-Akaishi T, Takahashi T, Nakashima I. (2018) Chloride imbalance between serum and CSF in the acute phase of neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol* 315(15), 45-49.
- 3.-Albanese M, Zagaglia S, Landi D, Boffa L, Nicoletti CG, Marciani MG, Mandolesi G, Marfia GA, Buttari F, Mori F, Centonze D. (2016) Cerebrospinal fluid lactate is associated with multiple sclerosis disease progression. *J Neuroinflammation* 10, 13-36.
- 4.-Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CG. (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7(3), 270-279.
- 5.-Almeida L, Lochner M, Berod L, Sparwasser T. (2016) Metabolic Pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin Immunol* 28(5), 514-524.
- 6.-Anderson KJ, Scheff SW, Miller KM, Roberts KN, Gilmer LK, Yang C, Shaw G. (2008) The phosphorylated axonal form of the neurofilament subunit NF-H (pNF-H) as a blood biomarker of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 25(9), 1079-1085.
- 7.Andrews FM, Matthews HK, Reed SM (1990). The ancillary techniques and test for diagnosing equine neurological disease. *Vet Med.* 85, 1325-1330.
- 8.-Aronson JK, Ferner RE. (2017) Biomarkers—A General Review. *Curr Protoc Pharmacol* 76(9), 1-17.
- 9.-Aronson JK. (2012) Research priorities in biomarkers and surrogate end-points. *Br J Clin Pharmacol* 73(6), 900-907.
- 10.-Aronson JK. (2017) Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceutical. *Br J Clin Pharmacol* 83(1), 8-19.
- 11.-Bailey E, Domenico P, Cunha BA. (2016) Bacterial or viral meningitis? Measuring lactate in CSF can help you know quickly. *Postgrad Med* 88(5), 217-219, 223.

- 12.-Bélaner M, Allaman I, Magistretti PJ. (2011) Differential effects of pro- and anti-inflammatory cytokines alone or in combinations on the metabolic profile of astrocytes. *J Neurochem* 116(4), 564-576.
- 13.-Bélaner M, Magistretti, PJ. (2009) The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci* 11, 281–295.
- 14.Benoist JF, Alberti C, Leclercq S, Rigal O, Jean-Louis R, Ogier de Baulny H, Porquet D, Biou D. (2003) Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations and their ratio in children: Age-related reference intervals. *Clin Chem* 49(3), 487-494.
- 15.-Bernardini M. (2010) Neurologia del cane e del gatto. 2<sup>nd</sup> ed. Milano, Poletto Editore.
- 16.-Berndt N, Rösner J, Haq R, Kann O, Kovács R, Holzhütter HG, Spies C, Liotta A. (2018) Possible neurotoxicity of the anesthetic propofol: evidence for the inhibition of complex II of the respiratory chain in area CA3 of rat hippocampal slices. *Arch Toxicol* 92(10), 3191-3205.
- 17.-Bönig L, Möhn N, Ahlbrecht J, Wurster U, Raab P, Puppe W, Sühs KW, Stangel M, Skripuletz T, Schwenkenbecher P. (2019). Leptomeningeal metastasis: the role of cerebrospinal fluid diagnostics. *Front Neurol* 10, 839.
- 18.-Braun C, Sakamoto A, Fuchs H, Ishiguro N, Suzuki S, Cui Y, Klinder K, Watanabe M, Terasaki T, Sauer A. (2017) Quantification of transporter and receptor proteins in dog brain capillaries and choroid plexus: relevance for the distribution in brain and CSF of selected BCRP and P-gp substrates. *Mol Pharm* 14(10), 3436-3447.
- 19.-Brinton EA, Mason RP. (2017) Prescription omega-3 fatty acid products containing highly purified eicosapentaenoic acid (EPA). *Lipids Health Dis* 16(1), 23.
- 20.-Brisby H, Olmarker K, Rosengren L, Cederlund CG, Rydevik B. (1999) Markers of nerve tissue injury in cerebrospinal fluid in patients with lumbar disc herniation and sciatica. *Spine (Phila Pa 1976)* 24(8), 742-746.
- 21.-Bruna J, González L, Miró J, Velasco R, Gil M, Tortosa A. (2009) Leptomeningeal carcinomatosis. Prognostic implications of clinical and cerebrospinal fluid features. *Cancer* 115(2), 381-389.

- 22.-Burgess RW, Crish SD. (2018) Editorial: Axonopathy in neurodegenerative disease. *Front Neurosci* 12, 769.
- 23.-Bustamante R, Aguado D, Cediel R, Gómez de Segura IA, Canfrán S. (2018) Clinical comparison of the effects of isoflurane or propofol anaesthesia on mean arterial blood pressure and ventilation in dogs undergoing orthopaedic surgery receiving epidural anaesthesia. *Vet J* 233, 49-54.
- 24.-Butterworth J, Gregory CR, Aronson LR. (1997) Selective alterations of cerebrospinal fluid amino acids in dogs with congenital portosystemic shunts. *Metab Brain Dis* 12(4), 299-306.
- 25.-Caines D, Sinclair M, Wood D, Valverde A, Dyson D, Gaitero L, Nykamp S. (2013) Evaluation of cerebrospinal fluid lactate and plasma lactate concentrations in anesthetized dogs with and without intracranial disease. *Can J Vet Res* 77(4), 297-302.
- 26.-Calabrese VP, Gruemer HD, James K, Hranowsky N, DeLorenz RJ. (1991) Cerebrospinal fluid lactate levels and prognosis in status epilepticus. *Epilepsia* 32(6), 816-821.
- 27.-Canter PH, Wider B, Ernst E. (2007) The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. *Rheumatology (Oxford)* 46(8), 1223-1233.
- 28.-Cao F, Yang XF, Liu WG, Hu WW, Li G, Zheng XJ, Shen F, Zhao XQ, Lv ST. (2008) Elevation of neuron-specific enolase and S-100b protein level in experimental acute spinal cord injury. *J Clin Neurosci* 15(5), 541-544.
- 29.-Cataldo AM, Broadwell RD. (1986) Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J Neurocytol* 15, 511-524.
- 30.-Cattai A, Rabozzi R, Ferasin H, Isola M, Franci P. (2018) Haemodynamic changes during propofol induction in dogs: new findings and approach of monitoring. *BMC Vet Res* 14(1), 282.
- 31.-Chandler WL, Fine JS, Emery M, Weaver D, Reichenbach D, Clayson KJ. (1988) Regional creatine kinase, adenylate kinase, and lactate dehydrogenase in normal canine brain. *Stroke* 19(2), 251-255.

- 32.-Chiro GD, Hammock MK, Bleyer WA. (1976) Spinal descent of cerebrospinal fluid in man. *Neurology* 26(1), 1-8.
- 33.-Chmelíková E, Bolechová P, Chaloupková H, Svobodová I, Jovicic M, Sedmíková M. (2019) Salivary cortisol as a marker of acute stress in dogs. A review. *Domest Anim Endocrinol* 72.
- 34.-Christensen HL, Barbuskaite D, Rojek A, Malte H, Christensen IB, Füchtbauer AC, Füchtbauer EM, Wang T, Praetorius J, Damkier HH. (2018) The choroid plexus sodium-bicarbonate cotransporter NBCe2 regulates mouse cerebrospinal fluid pH. *J Physiol* 596(19), 4709-4728.
- 35.-Chuen Choi SY, Collins CC, Gout PW, Wang Y. (2013) Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J Pathol* 230, 350-355.
- 36.-Cooper AJ, Jeitner TM. (2016) Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain. *Biomolecules* 6(2), 16.
- 37.-Creevy KE, Gagnepain JF, Platt SR, Edwards GL, Kent M. (2013) Comparison of concentrations of  $\gamma$ -aminobutyric acid and glutamate in cerebrospinal fluid of dogs with idiopathic epilepsy with and without seizure-related magnetic resonance imaging hyperintense areas in the limbic system. *Am J Vet Res* 74(8), 1118-1125.
- 38.-Crupi R, Impellizzeri D, Cuzzocrea S. (2019) Role of metabotropic glutamate receptors in neurological disorders. *Front Mol Neurosci* 12, 20.
- 39.-Cunha BA. (2011) Cerebrospinal fluid lactic acid levels: Accurate, fast, and inexpensive. *Crit Care* 39(10), 2384-5.
- 40.-Dahms I, Bailey-Hall E, Salem Jr, N. (2016) Kinetics of docosahexaenoic acid ethyl ester accumulation in dog plasma and brain. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 113, 1-8.
- 41.-Daliu P, Santini A, Novellino E. (2018) A decade of nutraceutical patents: where are we now in 2018? *Expert Opin Ther Pat* 28(12), 875-882.
- 42.-Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. (2013) Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol Rev* 93(4), 1847-1892.
- 43.-Danbolt NC. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65(1), 1-105.
- 44.-Dash PC, Patro D. (2014) Role of csf ck, ldh, ggtp enzyme levels in diagnostic and prognostic evaluation of meningitis. *J Clin Diagn Res* 8(7), 19-22.

- 45.-Day NPJ, Phu NH, Mai NTH, Chau TTH, Loc PP, Chuong LV, Sinh DX, Holloway P, Hien TT, White NJ. (2000) The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria. *Crit Care Med* 28(6), 1833-1840.
- 46.-de la Monte SM. (2012) Contribution of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs* 72, 49-66.
- 47.-De la Hunta A, Glass EN. (2009) Veterinary neuroanatomy and clinical neurology. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis, Missouri, Saunders-Elsevier.
- 48.-Demine S, Renard P, Arnould T. (2019) Mitochondrial uncoupling: a key controller of biological processes in physiology and diseases. *Cells* 8(8), 795.
- 49.-Di Terlizzi R, Platt S. (2006) The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I – Function and composition. *Vet J* 172, 422-431.
- 50.-Di Terlizzi R, Platt S. (2009) The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part II - analysis. *Vet J* 180(1), 15-32.
- 51.-Díaz-Maroto Cicuéndez I, Fernández-Díaz E, García-García J, Jordán J, Fernández-Cadenas I, Montaner J, Serrano-Heras G, Segura T. (2017) The UCP2-866G/A polymorphism could be considered as a genetic marker of different functional prognosis in ischemic stroke after recanalization. *Neuromolecular Med* 19(4), 571-578.
- 52.-DiBartola SP. (2012) Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders. 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri.
- 53.-Djukic M, Schulz D, Schmidt H, Lange P, Nau RZ. (2012) Cerebrospinal fluid findings in geriatric patients from 2008 to 2011. *Zeitschrift fur Gerontologia und Geriatrie* 46, 353-357.
- 54.-Donato R. (2001) S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33(7), 637-668.
- 55.-Dowling ALS, Head E. (2012) Antioxidants in the Canine Model of Human Aging. *Biochim Biophys Acta* 1822(5), 685-689.
- 56.-Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien

- J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6(8), 734-746.
- 57.-Dugdale A. (2010) *Veterinary Anaesthesia. Principles to Practice*. 1<sup>st</sup> ed. United Kingdom, Willey-Blackwell.
- 58.-Efros AL, Delehanty JB, Huston AL, Medintz IL, Barbic M, Harris TD. (2018) Evaluating the potential of using quantum dots for monitoring electrical signals in neurons. *Nat Nanotechnol* 13(4), 278-288.
- 59.-Ellenberger C, Mevissen M, Doherr M, Scholtysik G, Jaggy A. (2004) Inhibitory and excitatory neurotransmitters in the cerebrospinal fluid of epileptic dogs. *Am J Vet Res* 65(8), 1108-1113.
- 60.-Faheem SA, Saeed NM, El-Naga RN, Ayoub IM, Azab SS. (2020) Hepatoprotective effect of cranberry nutraceutical extract in non-alcoholic fatty liver model in rats: impact on insulin resistance and Nrf-2 expression. *Front Pharmacol* 11, 218.
- 61.-Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. (2015) Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism. *Int J Mol Sci* 16(11), 25959-25981.
- 62.-Featherstone DE, Shippy SA. (2008) Regulation of synaptic transmission by ambient extracellular glutamate. *Neuroscientist* 14(2), 171-181.
- 63.-Felker GM. (2010) Coenzyme Q10 and statins in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 56(15), 1205-1206.
- 64.-Ferreira A. (2016) Diagnostic value of creatine kinase activity in canine cerebrospinal fluid. *Can Vet J* 57(10), 1081-1086.
- 65.-Finsterer J, Aliyev R. (2017) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy variant with creatine kinase elevation and vanishing effect of immunoglobulins. *Am J Case Rep* 18, 834-838.
- 66.-FitzGerald GA. (2016) Measure for Measure: Biomarker standards and transparency. *Sci Transl Med* 8(343).
- 67.-Forsberg M, Seth H, Björefeldt A, Lyckenvik T, Andersson M, Wasling P, Zetterberg H, Hanse E. (2019) Ionized calcium in human cerebrospinal fluid and

- its influence on intrinsic and synaptic excitability of hippocampal pyramidal neurons in rats. *J Neurochem* 149(4), 452-470.
- 68.-Gao X, Liu J, Li L, Liu W, Sun M. (2020) A brief review of nutraceutical ingredients in gastrointestinal disorders: evidence and suggestions. *Int J Mol Sci* 21(5).
- 69.-Gazda K, Kuznicki J, Wegierski T. (2017) Knockdown of amyloid precursor protein increases calcium levels in the endoplasmic reticulum. *Sci Rep* 7(1).
- 70.-Ghaffari H, Grant SC, Petzold LR, Harrington MG. (2020) Regulation of CSF and brain tissue sodium levels by the blood-CSF and blood-brain barriers during migraine. *Front Comput Neurosci* 14(4).
- 71.-Gladden LB. (2004) Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol* 558(Pt1), 5-30.
- 72.-Glade MJ, Smith K. (2015) Phosphatidylserine and the human brain. *Nutrition* 31(6), 781-786.
- 73.-Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, and MacVicar BA. (2008) Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456, 745–749.
- 74.-Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. (2014) Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci* 71, 2577-2604.
- 75.-Guéz M, Hildingsson C, Rosengren L, Karlsson K, Toolanen G. (2003) Nervous tissue damage markers in cerebrospinal fluid after cervical spine injuries and whiplash trauma. *J Neurotrauma* 20(9), 853-858.
- 76.-Guglielmotto M, Giliberto L, Tamagno E, Tabaton M. (2010) Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front Aging Neurosci* 2, 3.
- 77.-Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Panickar KS, Bobe G, Jewell DE. (2015) Nutritional interventions that slow the age-associated decline in renal function in a canine geriatric model for elderly humans. *J Nutr Health Aging* 20(10), 1010-1023.
- 78.-Hamilton PD, Bozeman SL, Andley UP. (2020) Creatine kinase/ $\alpha$ -crystallin interaction functions in cataract development. *Biochem Biophys Rep* 22, 100748.

- 79.-Hanselman B, Kruth S, Poma R, Nykamp S. (2006) Hypernatremia and hyperlipidemia in a dog with central nervous system lymphosarcoma. *J Vet Intern Med* 20(4), 1029-1032.
- 80.-Head E, Zicker SC. (2004) Nutraceuticals, aging, and cognitive dysfunction. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 34, 217-228.
- 81.-Head E. (2009) Oxidative damage and cognitive dysfunction: antioxidant treatment to promote healthy brain aging. *Neurochem Res* 34, 670-678.
- 82.-Head E. (2011) Neurobiology of the aging dog. *Age (Dordr)* 33(3), 486-496.
- 83.-Heath SE, Barabas S, Craze PG. (2007) Nutritional supplementation in cases of canine cognitive dysfunction—A clinical trial. *Appl Anim Behav Sci* 105, 284-296.
- 84.-Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernandez E, Maestre C, Moncada S, and Bolanos JP. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/ C-Cdh1. *Nat Cell Biol* 11, 747–752.
- 85.-Hladky SB, Barrand MA. (2016) Fluid and ion transfer across the blood–brain and blood–cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles. *Fluids Barriers CNS* 13(19), 1-69.
- 86.-Horn T, Klein J. (2010) Lactate levels in the brain are elevated upon exposure to volatile anesthetics: a microdialysis study. *Neurochem Int* 57(8), 940-947.
- 87.-Jacobson LS, Lobetti RG. (2005) Glucose, lactate, and pyruvate concentrations in dogs with babesiosis. *Am J Vet Res* 66(2); 244-250.
- 88.-Jaggy A. (2010) Small Animal Neurology. An illustrated text. 1<sup>st</sup> ed. Hannover, Schlütersche.
- 89.-Jankovic J. (2007) Parkinson’s disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(4), 368-376.
- 90.-Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D. (2009) Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J Neurosci* 41, 12795-12801.
- 91.-Kay L, Tokarska-Schlattner M, Quenot-Carrias B, Goudet B, Bugert P, Arnold H, Scheuerbrandt G, Schlattner U. (2017) Creatine kinase in human erythrocytes: A genetic anomaly reveals presence of soluble brain-type isoform. *Blood Cells Mol Dis* 64, 33-37.

- 92.-Kayser EB, Sedensky MM, Morgan PG. (2004) The effects of complex I function and oxidative damage on lifespan and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 125(6), 455-464.
- 93.-Kazemi H, Choma L. (1977) H<sup>+</sup> transport from CNS in hypercapnia and regulation of CSF [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 42(5), 667-672.
- 94.-Kazemi H, Johnson DC. (1986) Regulation of cerebrospinal fluid acid-base balance. *Physiol Rev* 66(4), 953-1037.
- 95.-Kazemi H, Valenca LM, Shannon DC. (1969) Brain and cerebrospinal fluid lactate concentration in respiratory acidosis and alkalosis. *Respir Physiol* 6(2), 178-186.
- 96.-Keen LE. (2014) Cerebrospinal fluid. Clinical biochemistry, physiology and diagnostic characteristics. 1<sup>st</sup> ed. New York, Nova Science Publishers.
- 97.-Kent M, Glass EN, Haley AC, Shaikh LS, Sequel M, Blas-Machado U, Bishop TM, Holmes SP, Platt SR. (2016) Hydrocephalus secondary to obstruction of the lateral apertures in two dogs. *Aust Vet J* 94(11), 415-422.
- 98.-Khaladj N, Teebken OE, Hagl C, Wilhelmi MH, Tschan C, Weissenborn K, Lichtinghagen R, Hoy L, Haverich A, Pichlmaier M. (2008) The Role of Cerebrospinal Fluid S100 and Lactate to Predict Clinically Evident Spinal Cord Ischaemia in Thoraco-abdominal Aortic Surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 36(1), 11-19.
- 99.-Kiewert C, Mdzinarishvili A, Hartmann J, Bickel U, Klein J. (2010) Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res* 1312C, 101-107.
- 100.-Kim SA, Lee SY, Kimura J, Shin NS. (2011) Effects of alprazolam on capture stress-related serum cortisol responses in Korean raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides koreensis*). *J Vet Sci* 12(1), 103-105.
- 101.-Kim SH, Fraser PE, Westaway D, St. George-Hyslop PH, Ehrlich ME, Gandy S. (2010) Group II metabotropic glutamate receptor stimulation triggers production and release of alzheimer's amyloid  $\beta$ 42 from isolated intact nerve terminals. *J Neurosci* 30(11), 3870-3875.
- 102.-Kim SH, Steele JW, Lee SW, Clemenson GD, Carter TA, Treuner K, Gadiant R, Wedel P, Glabe C, Barlow C, Ehrlich ME, Gage FH, Gandy S. (2014)

- Proneurogenic Group II mGluR antagonist improves learning and reduces anxiety in Alzheimer A $\beta$  oligomer mouse. *Mol Psychiatry* 19(11), 1235-1242.
- 103.-Klein BG, Cunningham JG. (2013) Cunningham's Text Book of Veterinary Physiology. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri.
- 104.-Kopanke JH, Chen AV, Brune JE, Brenna AC, Thomovsky SA. (2018) Reference intervals for the activity of lactate dehydrogenase and its isoenzymes in the serum and cerebrospinal fluid of healthy canines. *Vet Clin Pathol* 47(2), 267-274.
- 105.-Kumosani TA, Moselhy SS. (2011) Modulatory effect of cod-liver oil on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in rat's brain. *Hum Exp Toxicol* 30, 267-274.
- 106.-Kunihara T, Shiiya N, Yasuda K, Japan S. (2001) Changes in S100 $\beta$  protein levels in cerebrospinal fluid after thoracoabdominal aortic operations. *J Thorac Cardiovas Surg* 122(5), 1019-1020.
- 107.-Kwon BK, Stammers AMT, Bélanger LM, Bernardo A, Chan D, Bishop CM, Slobogean GP, Zhang H, Umedaly H, Giffin M, Street J, Boyd MC, Paquette SJ, Fisher CG, Dvorak MF. (2010) Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 27(4), 669-682.
- 108.-LaMonaca E, Fodale V. (2012) Effects of anesthetics on mitochondrial signaling and function. *Curr Drug Saf* 7(2), 126-139.
- 109.-Landsberg GM, Nichol J, Araujo JA. (2012) Cognitive dysfunction syndrome: a disease of canine and feline brain aging. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 42(4), 749-768.
- 110.-Lannitti T, Palmieri B. (2010) Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr* 29(6), 701-725.
- 111.-Lauretani F, Maggio M, Pizzarelli F, Michelassi S, Ruggiero C, Ceda GP, Bandinelli S, Ferrucci L. (2009) Omega-3 and renal function in older adults. *Curr Pharm Des* 15(36); 4149-4156.
- 112.-Lee H, Kang H, Sung Ko B, Oh J, Ho Lim T, Cho Y. (2020) Initial creatine kinase level as predictor for delayed neuropsychiatric sequelae associated with acute carbon monoxide poisoning. *Am J Emerg Med* 10.1016/j.ajem.2020.02.054 (publicación electrónica previa a la publicación en papel).

- 113.-Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Leferink M, Hofste T, van Engelen BG, Wevers RA, Arthur T, Bahi-Buisson N, Ballhausen D, Bekhof J, van Bogaert P, Carrilho I, Chabrol B, Champion MP, Coldwell J, Clayton P, Donner E, Evangelidou A, Ebinger F, Farrell K, Forsyth RJ, de Goede CGEL, Gross S, Grunewald S, Holthausen H, Jayawant S, Lachlan K, Laugel V, Leppig K, Lim MJ, Mancini G, Della Marina A, Martorell L, McMenemy J, Meuwissen MEC, Mundy H, Nilsson NO, Panzer A, Poll-The BT, Rauscher C, Rouselle CMR, Sandvig I, Scheffner T, Sheridan E, Simpson N, Sykora P, Tomlinson R, Trounce J, Webb D, Weschke B, Scheffer H, Willemsen MIA (2010). Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain* 133(pt3), 655-670.
- 114.-Leen WG, Willemsen MA, Wevers RA, Verbeek MM. (2012) Cerebrospinal fluid glucose and lactate: age-specific reference values and implications for clinical practice. *PloS One* 7(8).
- 115.-Levine JM, Fosgate GT, Chen AV, Rushing R, Nghiem PP, Platt SR, Bagley RS, Kent M, Hicks DG, Young BD, Schatzberg SJ. (2009) Magnetic resonance imaging in dogs with neurologic impairment due to acute thoracic and lumbar intervertebral disk herniation. *J Vet Intern Med* 23(6), 1220-1226.
- 116.-Levy B. (2006) Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care* 12(4), 315-321.
- 117.-Li J, Zhu X, Yang S, Xu H, Guo M, Yao Y, Huang Z, Lin D. (2019) Lidocaine attenuates cognitive impairment after isoflurane anesthesia by reducing mitochondrial damage. *Neurochem Res* 44(7), 1703-1714.
- 118.-Li SH, Li XJ. (2004) Huntingtin–protein interactions and the pathogenesis of Huntington’s disease. *Trends Genet* 20(3), 146-154.
- 119.-Li YC, Wang R, Xu MM, Jing XR, Aa J, Sun RB, Na SJ, Liu T, Ding XS, Sun CY, Ge WH. (2018) Aneurysmal subarachnoid hemorrhage onset alters pyruvate metabolism in poor-grade patients and clinical outcome depends on more: a cerebrospinal fluid metabolomic study. *ACS Chem Neurosci* 10(3), 1660-1667.
- 120.-Liguori C, Stefani A, Sancesario G. (2015). CSF lactate levels, [TAU] proteins, cognitive decline: a dynamic relationship in Alzheimer’s disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86(6), 655-666.

- 121.-Loaiza A, Porras OH, Barros LF. (2003) Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 23(19), 7337-7342.
- 122.-Löbert V, Mischke R, Tipold A. (2003) Laktat-und pyruvat-bestimmung in plasma und liquor cerebrospinalis beim hund. *Kleinterpraxis* 48, 735-743.
- 123.-López I, Aguilera-Tejero E, Estepa JC, Bas S, Mayer-Valor R, Jiménez A, Rodríguez M. (2005) Diurnal variations in the plasma concentration of parathyroid hormone in dogs. *Vet Rec* 157(12), 344-347.
- 124.-Loy DM, Sroufe AE, Pelt JL, Burke DA, Cao QL, Talbott JF, Whittemore SR. (2005) Serum biomarkers for experimental acute spinal cord injury: rapid elevation of neuron specific enolase and S-100 $\beta$ . *Neurosurgery* 56(2), 391-397.
- 125.-Lu J. (2019) The Warburg metabolism fuels tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 38(1-2), 157-164.
- 126.-Lubieniecka J, Streijger F, Lee JHT, Stoynov N, Liu J, Mottus R, Pfeifer T, Kwon BK, Coorssen JR, Foster LJ, Grigliatti TA, Tetzlaff W. (2011) Biomarkers for severity of spinal cord injury in the cerebrospinal fluid of rats. *PloS One* 6(4).
- 127.-Lundblad M, Picconi B, Lindgren H, Cenci MA. (2004) A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 16(1), 110-123.
- 128.-Lying-Tunell U, Lindblad BS, Malmlund HO, Persson B. (1981) Cerebral blood flow and metabolic rate of oxygen, glucose, lactate, pyruvate, ketone bodies and amino acids. *Acta Neurol Scand* 63, 337-350.
- 129.-Ma J, Novikov LN, Karlsson K, Kellerth JO, Wiberg M. (2001) Plexus avulsion and spinal cord injury increase the serum concentration of S-100 protein: an experimental study in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 35(4), 355-359.
- 130.-Mackay BM, Curtis N. (1999) Adipsia and hypernatraemia in a dog with focal hypothalamic granulomatous meningoencephalitis. *Aust Vet J* 77(1), 14-17.
- 131.-Magi S, Piccirillo S, Amoroso S, Lariccia V. (2019) Excitatory amino acid transporters (EAATs): glutamate transport and beyond. *Int J Mol Sci* 20(22), pii: E5674.

- 132.-Magistretti PJ, Pellerin L (1997) Metabolic coupling during activation: a cellular view. *Adv Exp Med Biol* 413, 161–166.
- 133.-Mallard JM, Rieser TM, Peterson NW. (2018) Propofol infusion-like syndrome in a dog. *Can Vet J* 59(11), 1216-1222.
- 134.-Manteca X. (2011) Nutrition and behaviour in senior dogs. *Top Companion Anim Med* 26, 33-36.
- 135.-Mariani CL, Nye CJ, Tokarz DA, Green L, Lau J, Zidan N, Early PJ, Guevar J, Muñana KR, Olby NJ, Miles S. (2019) Cerebrospinal fluid lactate in dogs with inflammatory central nervous system disorders. *J Vet Intern Med* 33(6), 2701-2708.
- 136.-Marquardt G, Setzer M, Seifert V. (2004) Protein S-100b as serum marker for prediction of functional outcome in metastatic spinal cord compression. *Acta Neurochir (Wien)* 146(5), 449-452.
- 137.-Marquardt G, Setzer M, Seifert V. (2004) Protein S-100b for individual prediction of functional outcome in spinal epidural empyema. *Spine (Phila Pa 1976)* 29(1), 59-62.
- 138.-Martin SB, Cenini G, Barone E, Dowling ALS, Mancuso C, Butterfield A, Murphy MP, Head E. (2011) *Neurosci Lett* 51(2), 92-95.
- 139.-Mattson Porth C, Matfin G. (2008) Pathophysiology. Concepts of altered health states. 8<sup>th</sup> ed. China, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- 140.-McCommis KS, Finck BN. (2015) Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochem J* 466(3), 443-454.
- 141.-McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, Nasca C. (2015) Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci* 18(10), 1353-1363.
- 142.-McLeish MJ, Kenyon GL. (2005) Relating structure to mechanism in creatine kinase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40(1), 1-20.
- 143.-Milgram NW, Head E, Zicker SC, Ikeda-Douglas CJ, Murphey H, Muggenburg B, Siwak C, Tapp D, Cotman CW. (2005) Learning ability in aged beagle dogs is preserved by behavioural enrichment and dietary fortification: a two-year longitudinal study. *Neurobiol Aging* 26(1), 77-90.
- 144.-Miller RD. (2015) Miller`s Anesthesia. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Elsevier.Saunders.

- 145.-Miyazaki M, Hashimoto T, Yoneda Y, Saijio T, Mori K, Ito M, Kuroda Y. (1998). Adrenocorticotrophic hormone therapy for infantile spasms alters pyruvate metabolism in the central nervous system. *Brain Dev* 20(5), 312-318.
- 146.-Muravchick S, Levy RJ. (2006) Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology* 105(4), 819-837.
- 147.-Mutoh T, Nishimura R, Sasaki N. (2001) Effects of nitrous oxide on mask induction of anesthesia with sevoflurane or isoflurane in dogs. *Am J Vet Res* 62(11), 1727-1733.
- 148.-Nadeson R, Goodchild CS. (1997) Antinociceptive properties of propofol: involvement of spinal cord gamma-aminobutyric acid(A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 1181–1186.
- 149.-Nattie EE, Edwards WH. (1981) CSF acid-base regulation and ventilation during acute hypercapnia in the newborn dog. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 50(3), 566-574.
- 150.-Nazir M, Wani WA, Malik, MA, Mir MR, Ashraf Y, Kawoosa K, Ali SW. (2017) Cerebrospinal fluid lactate: a differential biomarker for bacterial and viral meningitis in children. *J Pediatr* 94(1), 88-92.
- 151.-Nicholatos JW, Robinette TM, Tata SVP, Yordy JD, Francisco AB, Platov M, Yeh TK, Ilkayeva OR, Huynh FK, Dokukin M, Volkov D, Weinstein MA, Boyko AR, Miller RA, Sokolov I, Hirschev MD, Libert S. (2019) Cellular energetics and mitochondrial uncoupling in canine aging. *Geroscience* 41(2), 229-242.
- 152.-Norwood JN, Zhang Q, Card D, Craine A, Ryan TM, DrewPJ. (2019) Anatomical basis and physiological role of cerebrospinal fluid transport through the murine cribriform plate. *Elife* 8.
- 153.-Nye CJ, Mariani CL. (2018) Validation of a portable monitor for assessment of cerebrospinal fluid lactate in dogs. *Vet Clin Pathol* 47(1), 108-114.
- 154.-Olby NJ, Sharp NJH, Muñana KR, Papich MG. (1999) Chronic and acute compressive spinal cord lesions in dogs due to intervertebral disc herniation are associated with elevation in lumbar cerebrospinal fluid glutamate concentration. *J Neurotrauma* 16(12), 1215-1224.

- 155.-Olmarker K, Rydevik B, Holm S, Bagge U. (1989) Effects of experimental graded compression on blood flow in spinal nerve roots. a vital microscopic study on the porcine cauda equina. *J Orthop Res* 7(6), 817-823.
- 156.-Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. (1995) alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19(2), 227-250.
- 157.-Pajares S, Arias A, García-Villoria J, Briones P, Ribes A. (2013) Role of creatine as biomarker of mitochondrial diseases. *Mol Genet Metab* 108(2), 119-124.
- 158.-Pan Y, Larson B, Araujo JA, Lau W, de Rivera C, Santana R, Gore A, Milgram NW. (2010) Dietary supplementation with medium-chain TAG has long-lasting cognition-enhancing effects in aged dogs. *Br J Nut* 12, 1746-1754.
- 159.-Pang DS, Boysen S. (2007) Lactate in veterinary critical care: pathophysiology and management. *J Am Anim Hosp Assoc* 43(5), 270-279.
- 160.-Papa L, Ramia MM, Edwards D, Johnson BD, Slobounov SM. (2015) Systematic review of clinical studies examining biomarkers of brain injury in athletes after sports-related concussion. *J Neurotrauma* 32(10), 661-673.
- 161.-Parnetti L, Gaiti A, Polidori MC, Brunetti M, Palumbo B, Chionne F, Cadini D, Cecchetti R, Senin U. (1995) Increased cerebrospinal fluid pyruvate levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 199(3), 231-233.
- 162.-Parnetti L, Reboldi G, Gallai V. (2000) Cerebrospinal fluid pyruvate levels in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurology* 54, 735-737.
- 163.-Patra KC, Hay N. (2014) The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* 39(8), 347-354.
- 164.-Pekala J, Patkowska-Sokola B, Bodkowski R, Jamroz D, Nowakowski P, Lochynski S, Librowski T. (2011) L-Carnitine - metabolic functions and meaning in humans life. *Curr Drug Metab* 12(7), 667-678.
- 165.-Peng K, Liu HY, Wu SR, Liu H, Zhang ZC, Ji FH. (2016) Does propofol anesthesia lead to less postoperative pain compared with inhalational anesthesia? A systematic review and metaanalysis. *Anesth Analg* 123, 846-858.
- 166.-Pham NT, Matsuki N, Shibuya M, Tamahara S, Ono K. (2008) Impaired expression of excitatory amino acid transport 2 (EAAT2) and glutamate homeostasis in canine necrotizing meningoencephalitis. *J Vet Med Sci* 70(10), 1071-1075.

- 167.-Platt S, Garossi L. (2012) Small animal neurological emergencies. 1<sup>st</sup> ed. United Kingdom, Manson Publishing Ltd.
- 168.-Platt SR, Olby NJ. (2004) BSAVA Manual of canine and feline neurology. 3<sup>rd</sup> ed. Gloucester, British Small Animal Veterinary Association.
- 169.-Plumb DC. (2011) Plumb's Veterinary Drug Handbook. 7<sup>th</sup> ed. United Kingdom, Willey-Blackwell.
- 170.-Pocernich CB, LaFontaine M, Butterfield DA. (2000) In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain. *Neurochem Int* 36(3), 185-191.
- 171.-Podell M, Hadjiconstantinou M. (1997) Cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid and glutamate values in dogs with epilepsy. *Am J Vet Res* 58(5), 451-456.
- 172.-Porras OH, Loaiza A, and Barros LF. (2004). Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24, 9669–9673.
- 173.-Pouw MH, Hosman AJF, VanMiddendorp JJ, Verbeek MM, Vos PE, VandeMeent H. (2009) Biomarkers in spinal cord injury. *Spinal Cord* 47(7), 519-525.
- 174.-Pugliese M, Carrasco JL, Andrade C, Mas E, Mascort J, Mahy N. (2005) Severe cognitive impairment correlates with higher cerebrospinal fluid levels of lactate and pyruvate in a canine model of senile dementia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(4), 603-610.
- 175.-Quistorff B, Grunnet N. The isoenzyme pattern of LDH does not play a physiological role; except perhaps during fast transitions in energy metabolism. *Aging (Albany NY)* 3(5), 457-460.
- 176.-Regenold WT, Phatak P, Makley MJ, Stone RD, Kling MA. (2008) Cerebrospinal fluid evidence of increased extra-mitochondrial glucose metabolism implicates mitochondrial dysfunction in multiple sclerosis disease progression. *J Neurol Sci* 275(1-2), 106-112.
- 177.-Reiner A, Levitz J. (2018) Glutamatergic signaling in the central nervous system: ionotropic and metabotropic receptors in concert. *Neuron* 98(6), 1080-1098.

- 178.-Ribeiro FM, Vieira LB, Pires RGW, Olmo RP, Ferguson SSG. (2017) Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res* 115, 179-191.
- 179.-Richard C, Calder PC. (2016) Docosahexaenoic acid. *Adv Nutr* 7(6), 1139-1141.
- 180.-Rojas DN, Kuner R, Agarwal N. (2019) Metabolomic signature of type 1 diabetes-induced sensory loss and nerve damage in diabetic neuropathy. *J Mol Med (Berl)* 97(6), 845-854.
- 181.-Roriz-Filho J, Sá-Roriz TM, Rosset I, Camozzato AL, Santos AC, Chaves ML, Moriguti JC, Roriz-Cruz M (2009) (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim Biophys Acta* 1792, 432-443.
- 182.-Rosenberg H, Sambughin N, Riazi S, Dirksen R. (2003) Malignant hyperthermia susceptibility. *GeneReviews* 19, 1-26.
- 183.-Rosol TJ, Capen CC. (1996) Pathophysiology of calcium, phosphorus, and magnesium metabolism in animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26(5), 1155-1184.
- 184.-Sagar SM, Sharp FR, Swanson RA. (1987) The regional distribution of glycogen in rat brain fixed by microwave irradiation. *Brain Res* 417, 172-174.
- 185.-Sahinovic MM, Struys MMRF, Absalom AR. (2018) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol. *Clin Pharmacokinet* 57(12), 1539-1558.
- 186.-Sams L, Braun C, Allman D, Hofmeister E. (2008) A comparison of the effects of propofol and etomidate on the induction of anesthesia and on cardiopulmonary parameters in dogs. *Vet Anaesth Analg* 35(6), 488-494.
- 187.-Sarmiento A, Diaz-Castro J, Pulido-Moran M, Kajarabille N, Guisado R, Ochoa JJ. (2016) Coenzyme Q10 Supplementation and Exercise in Healthy Humans: A Systematic Review. *Curr Drug Metab* 17(4), 345-358.
- 188.-Schurr A, Miller JJ, Payne RS, Rigor BM. (1999) An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *J Neurosci* 19(1), 34-39.
- 189.-Secer HI, Izci Y. (2008) The CSF creatine kinase-BB isoenzyme activity in experimental lumbar spinal stenosis model. *J Spinal Disord Tech* 21(2), 148-152.

- 190.-Silverstein DC, Hopper K. (2015) Small Animal Critical Care Medicine. 2<sup>nd</sup> ed. Elseviers Saunders, St. Louis, Missouri.
- 191.-Simon MJ, Liff JJ. (2016) Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1862(3), 442-451.
- 192.-Simone IL, Federico F, Trojano M. (1996) High resolution proton MR spectroscopy of cerebrospinal fluid in MS patients. Comparison with biochemical changes in demyelinating plaques. *J Neurol Sci* 144, 182-190.
- 193.-Skerritt G. (2018) King's Applied anatomy of the central nervous system of domestic mammals. 2<sup>nd</sup> ed. Pondicherry, India, Wiley-Blackwell.
- 194.-Smith D, Pernet A, Hallett WA, Bingham E, Marsden PK, Amiel SA. (2003) Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(6), 658-664.
- 195.-Söbbeler FJ, Carrera I, Pasloske K, Ranasinghe MG, Kircher P, Kästner SBR. (2018) Effects of isoflurane, sevoflurane, propofol and alfaxalone on brain metabolism in dogs assessed by proton magnetic resonance spectroscopy (H MRS). *BMC Vet Res* 14(1), 69.
- 196.-Söder J, Höglund K, Dicksved J, Hagman R, Röhnisch HE, Moazzami AA, Wernersson S. (2019) Plasma metabolomics reveals lower carnitine concentrations in overweight Labrador Retriever dogs. *Acta Vet Scand* 61(1), 10.
- 197.-Sokolowski W, Czubaj N, Skibniewski M, Barszcz K, Kupczynska M, Kinda W, Kielbowicz Z. (2018) Rostral cranial fossa as a site for cerebrospinal fluid drainage – volumetric studies in dog breeds of different size and morphotype. *BMC Vet Res* 14(1), 162.
- 198.-Sonnay S, Duarte JMN, Just N, Gruetter R. (2017) Energy metabolism in the rat cortex under thiopental anaesthesia measured. In vivo by C MRS. *J Neurosci Res* 95(11), 2297-2306.
- 199.-Straus SE, Thorpe KE, Holroyd-Ledue J. (2006) How do I perform a lumbar puncture and analyze the results to diagnose bacterial meningitis?. *JAMA* 296(16), 2012-2022.
- 200.-Sugi T, Fujishima M, Omae T. (1975) Lactate and pyruvate concentrations, and acid-base balance of cerebrospinal fluid in experimentally induced intracerebral and subarachnoid hemorrhage in dogs. *Stroke* 6(6), 715-719.

- 201.-Sullivan LA, Campbell VL, Klopp S, Rao S. (2009) Blood lactate concentrations in anesthetized dogs with intracranial disease. *J Vet Intern Med* 23, 488-492.
- 202.-Sullivan SA, Harmon BG, Purinton T, Greene CE, Glerum LE. (2003) Lobar holoprosencephaly in a Miniature Schnauzer with hypodipsic hypernatremia. *J Am Vet Med Assoc* 223(12), 1783-1787.
- 203.-Tarnaris A, Toma AK, Chapman MD, Petzold A, Keir G, Kitchen ND, Watkins LD (2011) Rostrocaudal dynamics of CSF biomarkers. *Neurochem Res* 36, 528-532.
- 204.-Tipold A. (2003) Cerebrospinal fluid. In: Clinical neurology in small animals – Localization, diagnosis and treatment. Ithaca, New York, USA.
- 205.-Travassos PB, Godoy G, deSouza HM, Curi R, Bazotte RB. (2018) Performance during a strenuous swimming session is associated with high blood lactate: pyruvate ratio and hypoglycemia in fasted rats. *Braz J Med Biol Res* 51(5).
- 206.-Vaagenes P, Safar P, Diven W, Moossy J, Rao G, Cantadore R, Kelsey S. (1988) Brain enzyme levels in CSF after cardiac arrest and resuscitation in dogs: markers of damage and predictors of outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 8(2), 262-275.
- 207.-Vámosi B, Diószeghy P, Molnár L. (1982) Lactate and pyruvate content of the human cisternal cerebrospinal fluid- *Arch Psychiatr Nervenkr* 232, 521-532.
- 208.-VanDongen EP, TerBeek HB, Schepns MA, Morshuis WJ, Haas FJ, DeBoer A, Boezeman EH, Aarts LP. (1999) The relationship between evoked potentials and measurements of S-100 protein in cerebrospinal fluid during and after thoracoabdominal aortic aneurism surgery. *J Vasc Surg* 30(2), 293-300.
- 209.-Vaughn DM, Coleman E, Simpson ST, Whitmer B, Satjawatcharaphong C. (1988) A rostrocaudal gradient for neurotransmitter metabolites and a caudorostral gradient for protein in canine cerebrospinal fluid. *Am J Vet Res* 49(12), 2134-2137.
- 210.-Venkatesh B, Morgan TJ, Boots RJ, Hall J, Siebert D. (2003) Interpreting CSF lactic acidosis: effects of erythrocytes and air exposure. *Crit Care Resusc* 5(3), 177-181.

- 211.-Villiers E, Blackwood L. (2009) Manual de diagnóstico de laboratorio en pequeños animales. 2<sup>nd</sup> ed. Barcelona, España, Ediciones.
- 212.-Vincent JL, Quintairo e Silva A, Couto Jr L, Taccone FS. (2016) The value of blood lactate kinetics in critically ill patients: a systematic review. *Crit Care* 20(1), 257.
- 213.-Walker MC, Van der Donk WA. (2016) The many roles of glutamate in metabolism. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43(0), 419-430.
- 214.-Walliman T, Hemmer W. (1994) Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133/134, 193-220.
- 215.-Wang Q, Michiue T, Ishikawa T, Zhu BL, Maeda H. (2011) Combined analyses of creatine kinase MB, cardiac troponin I and myoglobin in pericardial and cerebrospinal fluids to investigate myocardial and skeletal muscle injury in medicolegal autopsy cases. *Leg Med (Tokyo)* 13, 226-232.
- 216.-Wei H, Kang B, Wei W, Liang G, Meng QC, Li Y, Eckenhoff RG. (2005) Isoflurane and sevoflurane affect cell survival and BCL-2/BAX ratio differently. *Brain Res* 1037(1-2), 139-147.
- 217.-Weiser MJ, Butt CM, Mohajeri MH. (2016) Docosahexaenoic acid and cognition throughout the lifespan. *Nutrients* 8(2), 99-139.
- 218.-Winnerkvist A, Anderson RE, Hansson LO, Rosengren L, Estrera AE, Huynh TTT, Porat EE, Safi HJ. (2007) Multilevel somatosensory evoked potentials and cerebrospinal proteins: indicators of spinal cord injury in thoracoabdominal aortic aneurysm surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 31(4), 637-642.
- 219.-Witsberger TH, Levine JM, Fosgate GT, Slater MR, Kerwin SC, Russell KE, Levine GJ. (2012) Associations between cerebrospinal fluid biomarkers and long-term neurologic outcome in dogs with acute intervertebral disk herniation. *J Am Vet Med Assoc* 240(5), 555-562.
- 220.-Yin W, Tibbs R, Aoki K, Badr A, Zhang J. (2001) Metabolic alterations in cerebrospinal fluid from double hemorrhage model of dogs. *Neurol Res* 23(1), 87-92.
- 221.-Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Chiarelli LR, Valentini G. (2007) Pyruvate kinase deficiency: The genotypephenotype association. *Blood Rev* 21(4), 217-231.

- 222.-Zhang WM, Natowicz MR. (2013) Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations and their ratio. *Clin Biochem* 46(7-8), 694-697.
- 223.-Zhang Y, Dong Y, Wu X, Lu Y, Xu Z, Knapp A, Yue Y, Xu T, Xie Z. (2010) The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis. *J Biol Chem* 285(6), 4025-4037.

## ABREVIATURAS

---

- µl: microlitro
- A-B: estado ácido base
- acetil-CoA: acetil coenzima A
- ACTH: hormona adrenocorticotropa
- ADH: hormona antidiurética
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADP: adenosil difosfato
- AE2: transportador específico de membrana bicarbonato/cloro
- ALP: fosfatasa alcalina
- ALT: alanina aminotransferasa
- AMPA: α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
- ASA: american society of anesthesiologists (método de clasificación de la gravedad de los pacientes durante el examen preanestésico).
- AST: aspartato aminotransferasa
- ATP: adenosín trifosfato
- BHE: barrera hematoencefálica
- Ca<sup>+2</sup>: calcio
- CAM: concentración alveolar mínima
- CK: creatina kinasa
- CKA: creatina kinasa ácida
- CKB: creatina kinasa básica
- CKE: creatina kinasa encefálica
- CKM: creatina kinasa muscular
- CL: cisterna lumbar
- Cl: cloro
- CM: cisterna magna
- CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono
- coQ10: coenzima Q10

- DHA: ácido docosahexanoico
- dL: decilitro
- D-Lactato: isómero dextrógiro de lactato (sintetizado a nivel bacteriano)
- DM: desacople mitocondrial
- EDI: enfermedad discal intervertebral
- EI: epilepsia idiopática
- ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción
- EPA: ácido eicosapentanoico
- Et: end-tidal
- FNT- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa
- FS: fosfatidilserina
- G6F: glucosa-6-fosfato
- GABA: ácido gamma-aminobutírico
- GDH: glutamato deshidrogenasa
- GFAP: proteína ácida fibrilar glial
- GGPT: gamma glutamil transpeptidasa
- GLUS: glutamato sintetasa
- GLUT1: transportador de glucosa 1
- Grupo-Iso: grupo isofluorano
- Grupo-Propo: grupo propofol
- H<sup>+</sup>: átomo de hidrógeno, hidrogenión
- H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: ácido carbónico
- H<sub>2</sub>O: agua
- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: bicarbonato
- iGLUR: receptor inotrópico de glutamato
- IL: interleucina
- IM: intramuscular
- IQR: Rango intercuartílico

- IV: intravenoso
- K<sup>+</sup>: potasio
- KCC3: cotransportador de cloruro potásico
- LCR: líquido cefalorraquídeo
- LDH: lactato deshidrogenasa
- LDL: lipoproteínas de baja densidad
- L-DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina
- L-Lactato: isómero levógiro de lactato (sintetizado a nivel de las células humanas)
- MEC: metabolismo energético cerebral
- MEN: meningoencefalitis necrotizante
- mEq/L: miliequivalentes por litro
- mg/kg/min: miligramos por kilogramo por minuto
- mg: miligramo
- Mg<sup>++</sup>: magnesio
- mGLUR: receptor metabotrópico de glutamato
- ml: mililitro
- mmHg: milímetros de mercurio
- mmol/L: milimoles por litro
- mV: milivoltios
- Na<sup>+</sup>: sodio
- Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa: bomba sodio potasio atpasa
- NAC: N-acetil cisteína
- NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
- NADH: nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
- NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NBCe2: cotransportador Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- NC: nutracéutico
- NFH: neurofilamento de cadena pesada

- NFL: neurofilamento de cadena ligera
- NFM: neurofilamento de cadena media
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- NMO: neuromielitis óptica
- NSE: enolasa neuronal específica
- O<sub>2</sub>: oxígeno
- OMS: organización mundial de la salud
- PAM: presión arterial media
- PaO<sub>2</sub>: presión arterial de oxígeno
- PET: tomografía por emisión de positrones
- Pfkfb3: 6-fosfofructosa-2-kinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa-3
- pH:  $-\log[H^+]$  (valor numérico del estado ácido-base de la sangre)
- PIC: presión intracraneal
- PK: piruvato kinasa
- P-TAU: proteína TAU fosforilada
- PUFA: ácido graso poliinsaturado
- PV: peso vivo
- Ratio L/P: ratio lactato/piruvato
- RCN: recuento de células nucleadas
- RGR: recuento de glóbulos rojos
- RL: radicales libres
- RM: resonancia magnética
- SARA: sistema activador reticular ascendente
- SDCC: síndrome de disfunción cognitiva canina
- SIP: síndrome de infusión de propofol
- SNC: sistema nervioso central
- SNP: sistema nervioso periférico
- T0: tiempo cero de extracción de LCR

- T3: tiempo de extracción de LCR a las 3 horas de la inducción
- TC: tomografía computarizada
- TCE: traumatismo craneoencefálico
- TIVA: anestesia total intravenosa
- TM: traumatismo medular
- TPM: transportador de piruvato mitocondrial
- T-TAU: proteína TAU total
- U/L: unidades internacionales por litro
- UCPs: proteínas de desacople
- UDFG: uridín difosfato glucosa
- Uniones tipo GAP: uniones comunicantes
- VPP: vía de la pentosa fosfato

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS  
DOCTORAL

---

---

Como se detalla a continuación, el desarrollo de esta Tesis Doctoral ha dado lugar, de forma directa o indirecta, a la elaboración de una serie de trabajos científicos publicados en revistas indexadas en el *Journal Citation Report* (JCR), capítulos de libros y comunicaciones a congresos nacionales.

### 1. Artículos científicos:

- Galán-Rodríguez A, Carletti BE, Morgaz-Rodríguez J, Gamito-Gómez A, Muñoz Rascón P, Martín-Suárez EM. (2013) Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations in healthy adult dogs. *Vet Rec* 173(10), 249.
- Galán A, Carletti BE, Morgaz J, Granados MM, Mesa I, Navarrete R, Lombardo R, Martínez CM, Martín-Suárez EM. (2014) Comparative study of select biochemical markers in cerebrospinal fluid of healthy dogs before and after treatment with nutraceuticals. *Vet Clin Pathol* 43(1), 72-77.
- **Seisdedos A**, Galán A, Carletti B, Quirós S, Funes F, Martín EM, Domínguez JM, Gómez R, Granados MM. (2019) Anesthetic effects of isoflurane and propofol on cerebrospinal fluid biochemical markers in healthy dogs. *Vet Clin Pathol* 48(2), 270-275.
- Galán A, **Seisdedos A**, Carletti BE, Quirós S, Martín EM, Menor D, Granados MM. Cisternal versus lumbar cerebrospinal fluid lactate concentration in healthy dogs. *Vet Med (Praha)* 65(2020), 297-300.

### 2. Capítulos de libros:

- Galán Rodríguez A, **Seisdedos Benzal A**, Martín Suárez, EM. (2019) “Capítulo 6. Ceguera” en *Medicina Interna en Pequeños Animales*. 1ª Edición. Elsevier ISBN: 978-84-9113-355-1.
- **Seisdedos Benzal A**, Galán Rodríguez A. (2019) “Capítulo 34: Alteración de pares craneales” en *Medicina Interna en Pequeños Animales*. 1ª Edición. Elsevier ISBN: 978-84-9113-355-1.

- Galán Rodríguez A, **Seisdedos Benzal A.** (2019) “Capítulo 53: Tetraparesia flácida” en Medicina Interna en Pequeños Animales. 1ª Edición. Elsevier ISBN: 978-84-9113-355-1.
- Galán Rodríguez A, **Seisdedos Benzal A.** “Capítulo 17: Sistema nervioso” en Manual Clínico del perro y el gato 3ª edición. (En edición).

### 3. Comunicaciones a congresos:

- Carletti BE, Granados MM, Quirós S, Funes F, Morgaz J, Muñoz-Rascón P, Ruiz P, Herrera M, Galán A. (2014) Evaluación de lactato, glucosa y glutamato en líquido cefalorraquídeo y plasma en perros durante anestesia general con Isoflurano o Propofol. X Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anestesia y Analgesia Veterinaria (SEAAV), Málaga, España.
- **Seisdedos A**, Galán A, Granados MM. (2018) Influencia del propofol e isoflurano en los marcadores bioquímicos del líquido cefalorraquídeo en perros sanos durante la anestesia. VI Congreso Científicos de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
  - Publicado como “Creando Redes Doctorales. Vol. VI “La Generación del Conocimiento” Universidad de Córdoba 2018, 189-192. ISBN: 978-84-9927-239-9.

## AGRADECIMIENTOS

---

Y por fin llegaron los agradecimientos... Tras años de mucho esfuerzo y dedicación puedo decir GRACIAS. Ha sido un camino muy duro, lleno de piedras en las que me he tropezado y me he vuelto a tropezar hasta que he aprendido a esquivarlas. He tenido mucho trabajo y poco tiempo para la tesis, aparecieron enemigos inoportunos a los que conseguimos vencer, una pandemia... pero también sucedieron cosas buenas. Una hipoteca con la mujer de mi vida, muchos amigos nuevos por el camino, un trabajo donde crezco cada día como veterinario, una nueva compañera de vida de 4 patas... y al final, experiencias de la vida, tanto buenas como malas, por las que sólo puedo dar las gracias.

En primer lugar tengo que dar las gracias a mis padres, Ernesto y Lola. Siempre me habéis apoyado en todo lo que he hecho. Habéis sabido aconsejarme en cada paso de mi vida, sin quitarme el placer de equivocarme y aprender de mis errores. Sin vosotros no estaría hoy aquí disfrutando de ser veterinario. Me habéis enseñado a portarme bien siempre, a ser humilde, agradecido, respetuoso y a seguir mi vida ayudando a los demás, sin perjudicar a nadie, valorando siempre las consecuencias de todos mis actos. Sólo puedo daros las gracias por la educación que me habéis dado y por estar siempre ahí.

“El tren... siempre el tren...” Qué te puedo decir hermano... Cuando cumpliste 18 te fuiste de casa y nuestros caminos se separaron un poco. Tú hiciste tu vida en Madrid, conociste a Elena en el jardín de los Leprechaum y luego a Suiza. Yo me quedé en Córdoba con Macarena, pero aunque estemos separados por miles de kilómetros seguimos tan unidos como de pequeños. Gracias por ser un referente para mí, por ayudarme cuando más lo he necesitado, gracias por cuidarme siempre como se cuida a un hermano pequeño y, aunque te lo digo menos de lo que debería, te quiero mucho, Ernesto.

Bendito día el que me viste por la calle con mi raqueta y me seguiste para ver dónde jugaba a tenis. Ese día cambió mi vida por completo y van ya casi 10 años juntos... Macarena, sin ti no habría podido acabar esta aventura. Has estado conmigo siempre que me he agobiado y lo he visto todo negro, has sabido ayudarme cuando mi cabezonería no se dejaba ayudar, me has animado a seguir, porque esto es lo que me conviene. Me apasiona empezar esta nueva etapa de mi vida junto a ti. Ahora empieza mi carrera universitaria y pronto comenzará la tuya, es una suerte que ambos tengamos

los mismos objetivos. Caminaremos de la mano para conseguirlos, apoyándonos el uno en el otro. Sólo puedo darte las gracias por la infinidad de momentos felices que hemos vivido en estos 10 años y por los que nos quedan por vivir.

A mi familia... Mis tíos Aurelio y Ani... Ani, mi segunda madre. Pocas personas de mi vida son tan fuertes como tú y por eso quiero darte las gracias. Me has enseñado que por muchas dificultades que te ponga la vida delante hay que seguir luchando y por supuesto, me has enseñado que la familia es lo primero. Gracias por ese espíritu de lucha que me has inculcado desde pequeño. A Elena, Miguel, Mari, Cristian y Clara, gracias por ayudarme de una u otra manera a conseguir mis objetivos, gracias por tantos buenos momentos juntos y por hacer este camino más fácil.

Alba, no sabes lo que has aportado a mi vida. Te conocí en tercero de carrera y me enganchaste, no sólo al apasionante mundo de la neurología, sino a la docencia universitaria. La pasión que le ponías al explicarnos a un puñado de alumnos, todavía desubicados, qué es ataxia y qué es paresia y tus demostraciones gráficas, me marcaron para siempre y pensé... ostras, yo quiero hacer eso. Siempre me dices que llegué en un momento de tu vida muy convulso, pero no nos engañemos... Alba, tu vida es una montaña rusa y me alegro de haber llegado cuando llegué, porque si hoy estoy escribiendo esto es gracias a ti y sólo a ti. Gracias por ser tan buena haciendo lo que haces, por inculcarme el placer de enseñar a los demás, pero sobre todo gracias por ser una gran amiga. Me ayudaste muchísimo en el momento más difícil de mi vida, sacando tiempo y fuerzas de donde no las había. Siempre me haces sonreír y gracias a tu alocada cordura siempre me haces entrar en razón. De verdad, Alba, gracias por ser el espejo donde mirarme para seguir creciendo personal y profesionalmente, gracias por todo. Te quiere, bebé Alexander, tu minion.

Amigos y compañeros del HCV, no me quiero dejar a ninguno. Julio, te conocí en la Asunción... madre mía cuánto has cambiado... quién me iba a decir por aquel entonces que íbamos a trabajar juntos en la UCI de un hospital como el HCV. Te emperraste durante mi internado en enseñarme anestesia y lo conseguiste. Tu afán de superación, tus ganas de aprender siempre cosas nuevas y tu capacidad de trabajo para estar siempre al día son inspiradoras.

Carles, fui tu alumno cuando eras becario y luego tu becario cuando eras VIR. Me impacta la capacidad que tienes para que todo lo que explicas parezca fácil y

también la manera en la que relativizas todo para que los problemas parezcan menos importantes. Desde la urgencia del gato me hiciste cambiar el chip, gracias por la seguridad que me diste en mí mismo, gracias por ser un mentor en el trabajo y un gran amigo fuera. Gracias por todos tus consejos. Y gracias a todos los VIRes por enseñarme teoría y práctica, pero sobre todo a amar esta profesión, con sus ventajas e inconvenientes. Carmen Martínez, siempre calmada ante la adversidad, gracias a tí trabajo en el HCV. Ali, cuántas urgencias hemos visto juntos por Dios. Viru, Bea, Sete, Aritz, Esther... equipazo HCV. Espero seguir compartiendo con todos vosotros muchísimas horas de trabajo, de aprendizaje y por supuesto de cervezas, peroles, congresos, bodas y celebraciones, porque no os cambiaría por nada del mundo. Gracias a todos por estar ahí. Con vuestros consejos, hasta hacer una tesis parece algo fácil.

Andrés, gracias por tu infinita paciencia, por tu empeño en hacer que todo funcione mejor. Juan, gracias por tu predisposición siempre para ayudarme en todo, desde estadísticas hasta casos complicados y por hacer más amenas las horas de quirófano de madrugada. Eva, mi choquera, siempre recordaré aquella conversación en la cafetería del Reina Sofía. Tu reflexión me ayudó mucho a relajarme y tomarme las cosas con más calma. Carmen Pineda, gracias por las horas de gasómetro, por las charlas en la sala de becarios intentando arreglar el mundo, por tu disposición a ayudarme siempre que lo he necesitado.

A mis amigos de siempre, los que parece que no ha pasado el tiempo cuando los vuelves a ver, Martín, Masu, Mari, Luisa, María, Jose, Isa... gracias por entender siempre mis horarios, por obligarme a desconectar de tanto trabajar. Gracias por estar siempre ahí para lo que necesite.

Quiero agradecer de forma muy especial a mis directoras, Alba y María del Mar. Gracias a las dos por aceptarme como doctorando, por hacer un hueco en vuestras agendas para que yo pudiera llevar a cabo todo este trabajo. Gracias Alba por sacar tiempo de debajo de las piedras para dedicarle a mi tesis. Muchas gracias María del Mar por tus sabios consejos, por tu ayuda cada vez que he tenido dudas de por dónde seguir, gracias por haber hecho posible este proyecto que hoy ve la luz.

Y por último, no quiero olvidarme de mi familia de 4 patas. Lupin y Troy, compañeros de viaje desde hace muchos años y mi razón de ser. Quiero agradecerle a Dios, al universo, al Karma... llámadlo como queráis, por enseñarme siempre el camino

por el que debo seguir. Hace un año me debatía entre seguir con mi carrera o dedicarme a otra cosa. Es una profesión dura, estamos sometidos siempre a mucho estrés y poco descanso pero las cosas ocurren siempre por una razón. Cuando más lo necesitaba aparecieron Gamora y Mica. Gamora, mi nueva compañera de cuatro patas, llegaste a mi vida para recordarme porqué me hice veterinario. De pequeño me dolía en el alma ver un animal desvalido en la calle y no saber ayudarlo, por eso decidí ser veterinario, para ayudar a todos aquellos animales que no pueden seguir solos. Mica, desgraciadamente ya no estás con nosotros pero de ti aprendí muchísimo. Me recordaste el otro pilar por el que sigo siendo veterinario, ayudar a las personas que adoran a sus animales y lo dan todo por ellos. Nunca se me olvidarán las caras de Noelia, José Antonio, Amalia y Antonio cuando Mica se fue a casa. No hay dinero en el mundo para pagar la satisfacción que sientes cuando devuelves a un animal que ha superado su enfermedad a los brazos de su familia. Gracias Gamora y Mica, por vosotras sigo levantándome cada día para ir a trabajar y seguir creciendo como veterinario y como persona.

Gracias a todos los que habéis compartido vuestro tiempo conmigo.

A mi abuela Adelita, te fuiste de este mundo, pero nunca de mi lado... 04/03...



## FE DE ERRATAS

---

---

- En el manuscrito enviado (Estudio 3) hay una errata en cuanto a las unidades de medición del lactato y piruvato tanto en los resultados como en la Tabla 1. Los valores aparecen en mg/dL y han sido modificados a mM/L en el manuscrito de esta Tesis Doctoral.

También ha sido modificado en el material y método el parámetro “total calcium (spectrophotometry [Atom A15, Biosystems, Barcelona, Spain])” por “ionized calcium (selective electrode (Bayer Diagnostics, Barcelona, España))”.

- Estas erratas serán corregidas durante las revisiones del manuscrito con la revista, así como las oportunas correcciones que sean requeridas.