



Implicación de los receptores AMPA en la etiopatogenia del autismo

Dr. Juan-José García Peñas

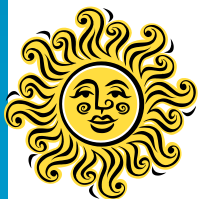
Sección de Neurología Pediátrica

Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Madrid

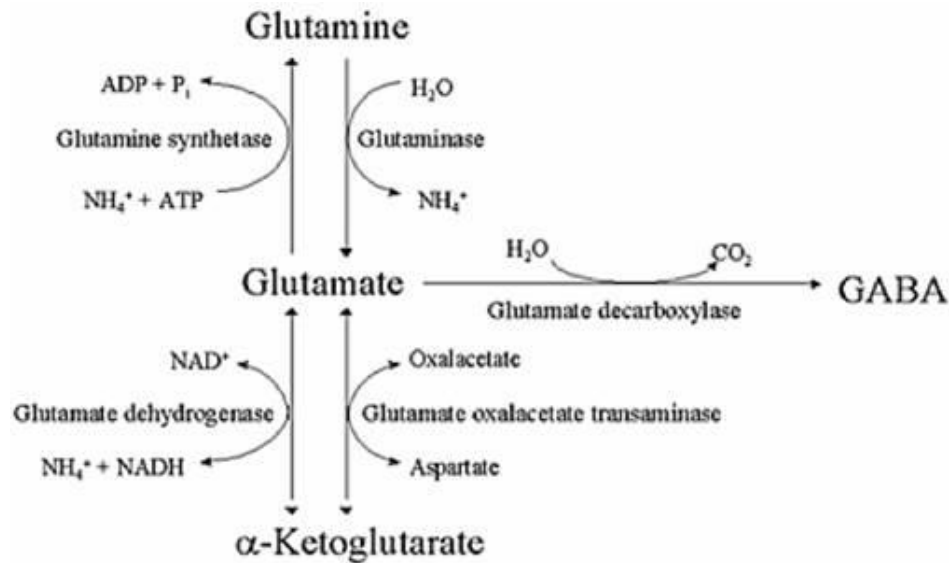
Unidad de Epilepsia

Hospital San Rafael. Madrid

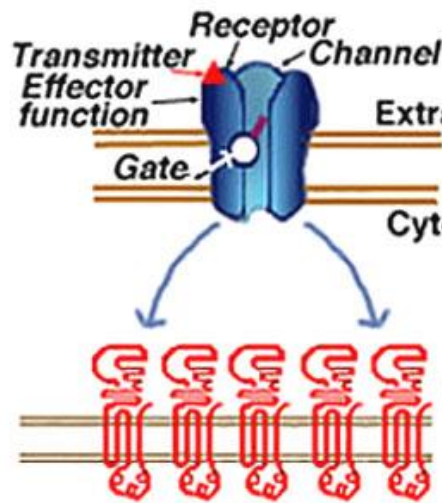
**X curso de abordaje multidisciplinar
de los trastornos del neurodesarrollo en la infancia
HRC. Madrid. Días 6 y 7 de Noviembre de 2014**



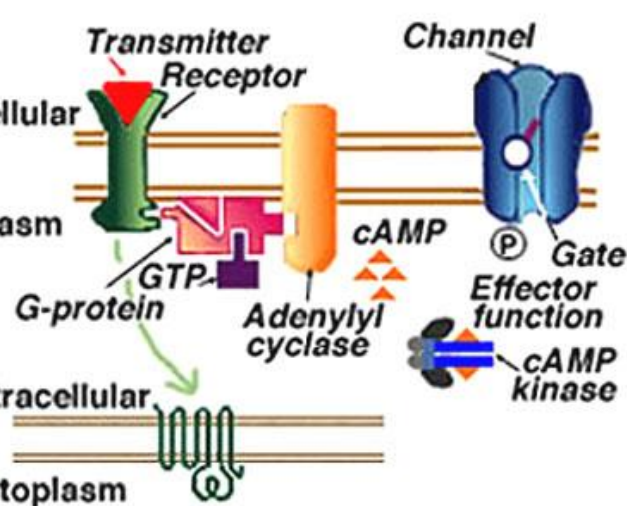
Conociendo al Glutamato y sus Receptores



Ionotropic receptor



Metabotropic receptor

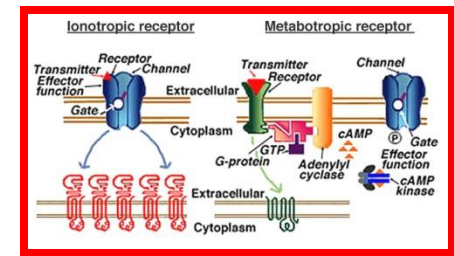


Glutamato como neurotransmisor excitatorio rápido en las sinapsis

- El glutamato modula la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria de las sinapsis del SNC.
 - Receptores ionotrópicos → canales iónicos.
 - Receptores metabotrópicos → vía del segundo mensajero.
- Tres tipos de receptores ionotrópicos excitatorios activados por glutamato:
 - **AMPA**: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid.
 - **NMDA**: N-methyl-D-aspartate.
 - **Kainato**: Kainic acid.

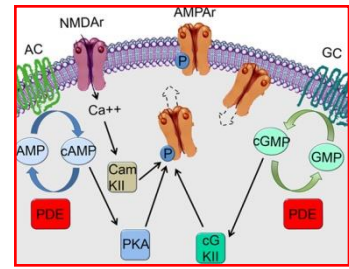


Receptores Metabotropos del Glutamato



- Los receptores de glutamato de tipo metabotrópico (mGluRs) son un tipo de receptor glutamatérgico que se activa de forma indirecta (metabotrópica).
- Son miembros de la familia C de los receptores acoplados con proteína G (GPCRs) y se ligan al aminoácido excitador glutamato.
- Se hallan a nivel presináptico y postsináptico.
- Intervienen en funciones activas del SNC como aprendizaje y memoria.
- Alta expresión en cerebelo e hipocampo.
- No son canales iónicos, aunque tienen 7 dominios transmembrana.
- ❖ Activan cascadas metabólicas que modifican canales iónicos → inhibición presináptica, cambios excitabilidad sinapsis, modulación respuestas postsinápticas.

Receptores AMPA y NMDA



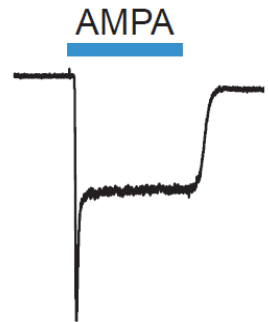
- **Receptores AMPA:**

- ❖ Principal mediador de los efectos excitatorios rápidos del GLU.
- ❖ Componente rápido del EPSP (*excitatory postsynaptic potential*).
- ❖ Excitabilidad neuronal / epileptogénesis.

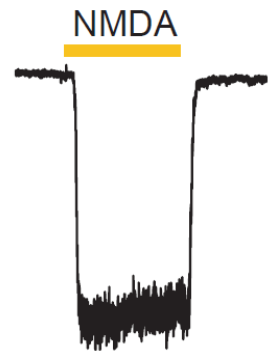
- **Receptores NMDA:**

- ❖ No media los efectos excitatorios rápidos del GLU.
- ❖ Componente lento del EPSP.
- ❖ Se bloquea por Magnesio.
- ❖ Plasticidad neuronal.

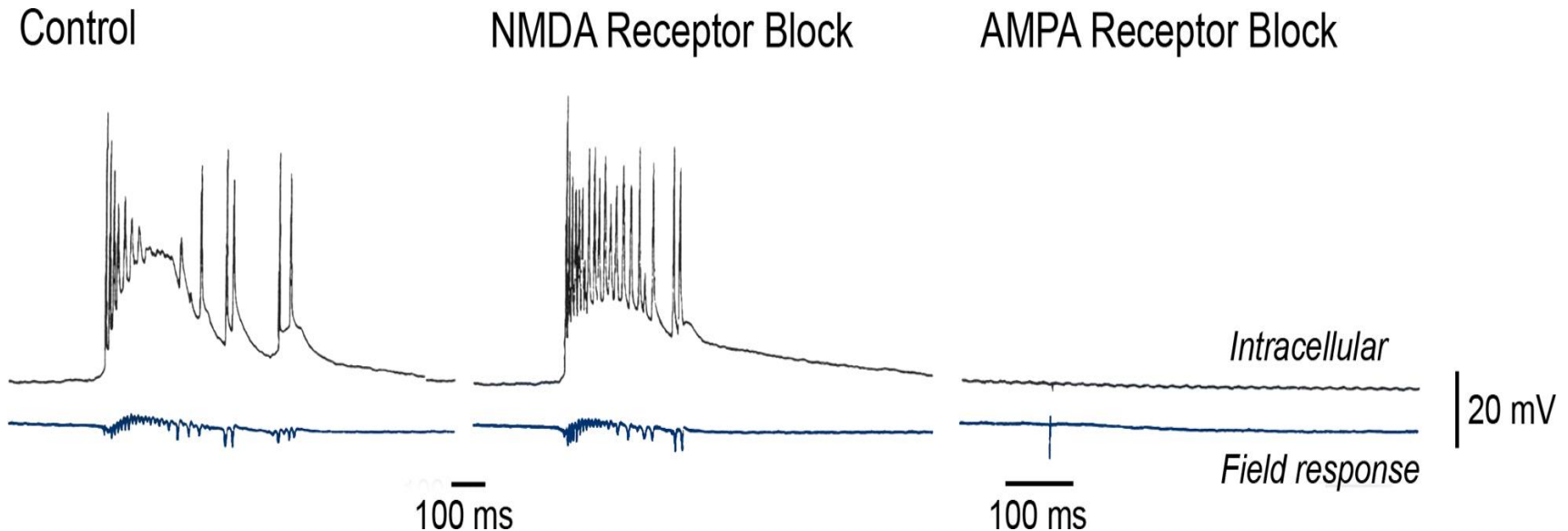
A1



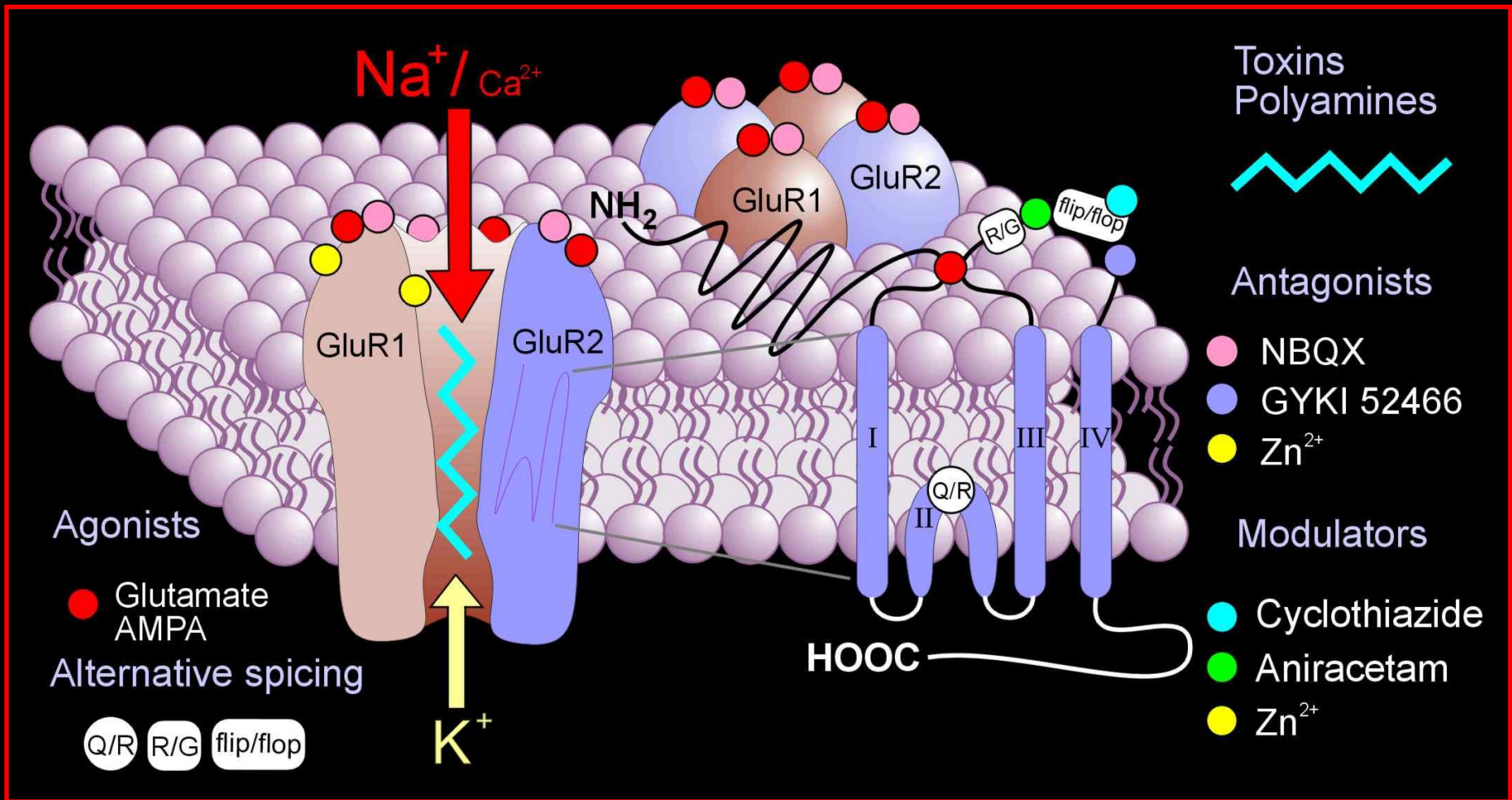
A2



Modelos Animales Receptor AMPA

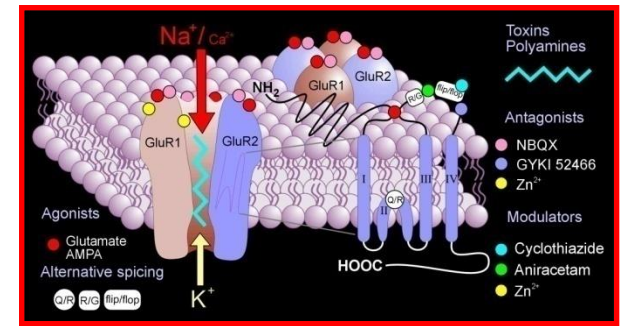


- Recording from guinea-pig hippocampal slice in presence of 50 μM picrotoxin.
- Bath application of NMDA receptor block (200 μM APV) eliminates late bursting but does not affect triggering of the initial epileptiform discharge.
- AMPA receptor block (20 μM CNQX) eliminates epileptiform bursting.



AMPA RECEPTOR

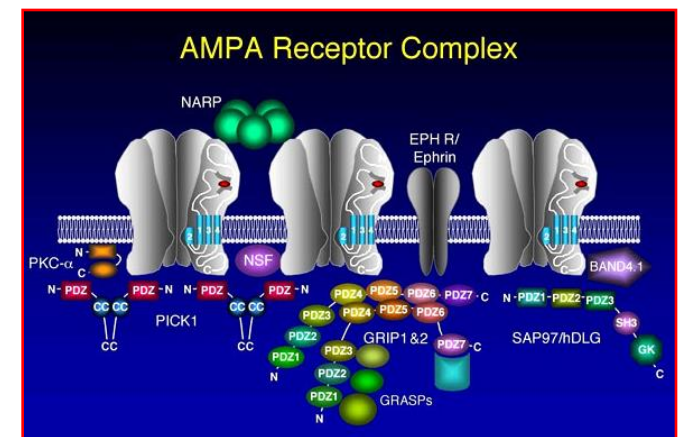
Receptores Glutamato AMPA-R



- Los receptores AMPA son **tetrámeros** compuestos por subunidades que en humanos presentan cuatro tipos diferentes.
- Como todos los receptores **ionotrópicos** de glutamato, **actúan como canales**.
- Para ello, al menos dos subunidades deben, cada una, unir a un agonista; esto **produce la apertura del poro**.
- **Una vez abierto, el canal se desensibiliza rápidamente**, lo que para el tráfico de cationes por su interior. Esta parada depende de un cambio conformacional que modifica el ángulo del sitio de unión, cerrando el poro.

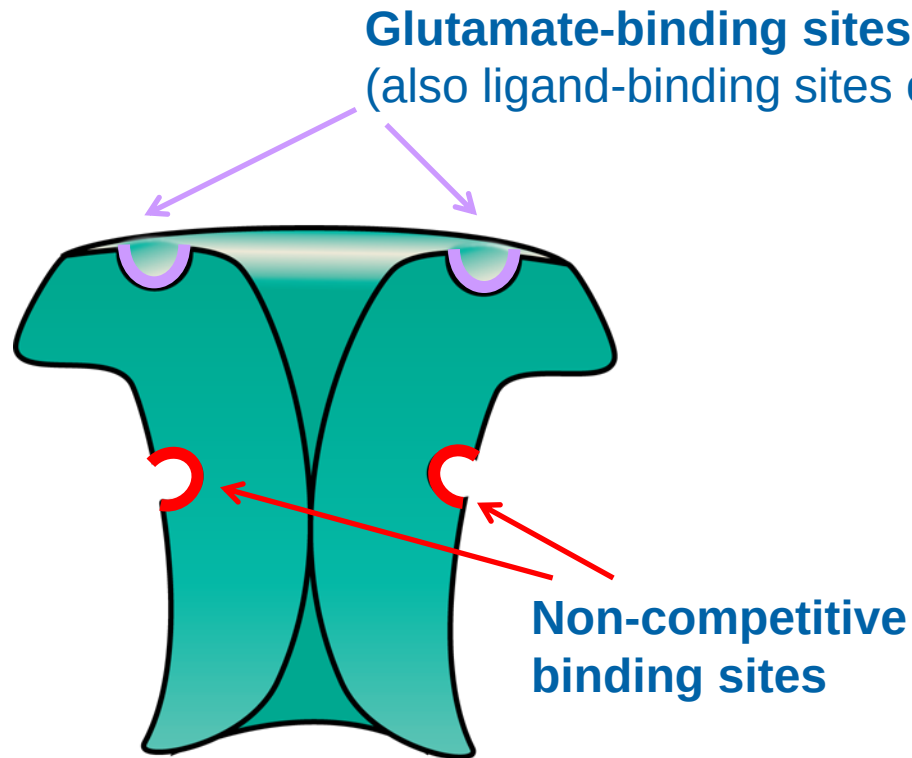
Receptores AMPA de Glutamato

- Inicio actividad hipersincrónica neuronal (EPSP).
- Propagación actividad epiléptica neuronal.
- Modelos animales de epileptogénesis.
- Mecanismo multimodal de algunos FAE:
 - Topiramato.
- Importante diana terapéutica:
 - Epileptogénesis.
 - Neuroprotección.

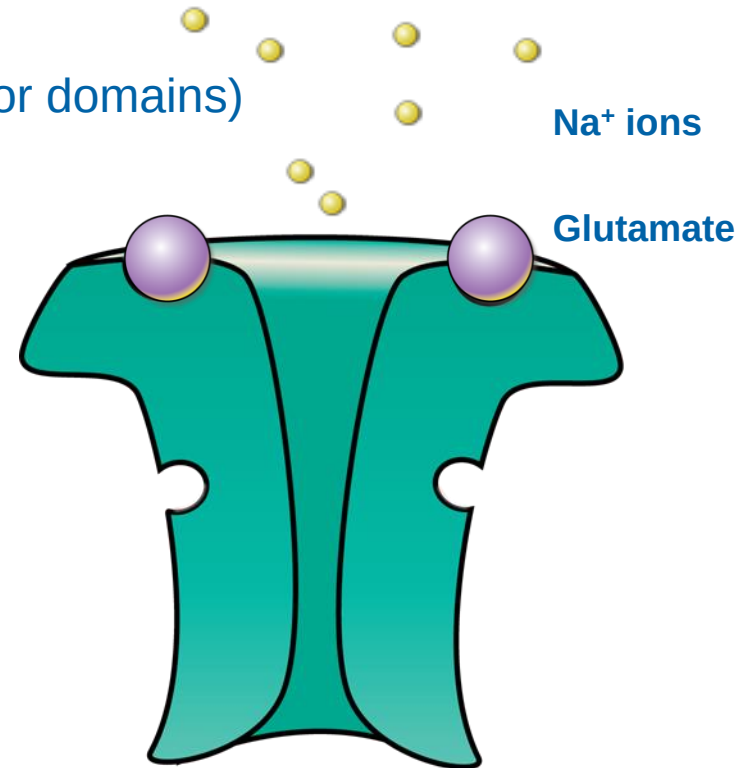


Estructura Receptor AMPA

AMPA receptor
(closed, inactive state)



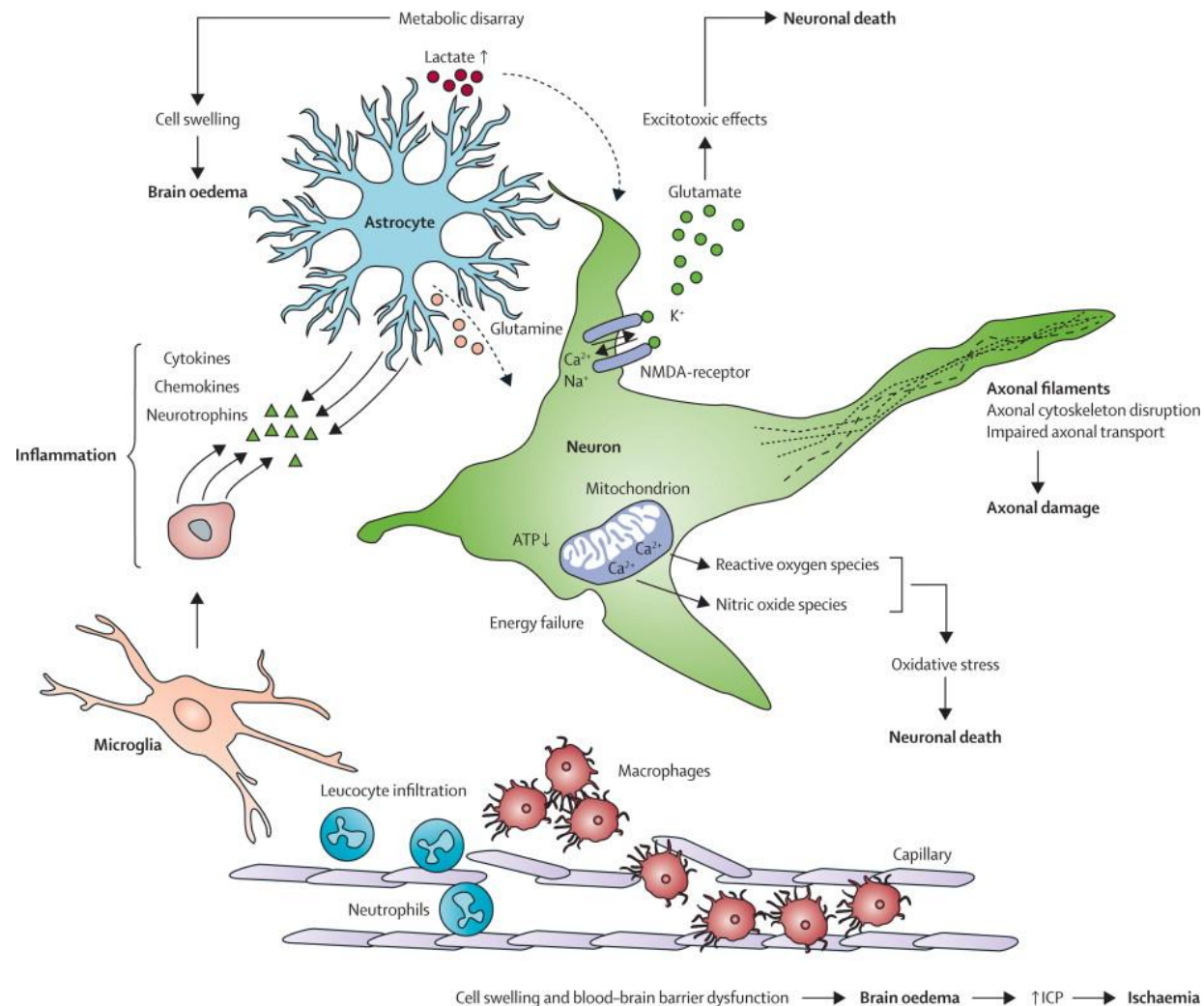
AMPA receptor
(open, active state)



The receptor's ion channel allows influx of Na⁺ ions (and sometimes Ca²⁺ ions) into the neuron

Glutamato y Daño Cerebral

Status Epiléptico y Crisis Agudas Repetitivas



GLUTAMATO Y DAÑO NEUROLÓGICO: IMPLICACIONES CLÍNICAS PARA EL DESARROLLO DEL NIÑO Y ADOLESCENTE



Neurodegeneración
aguda y crónica^{1,2}



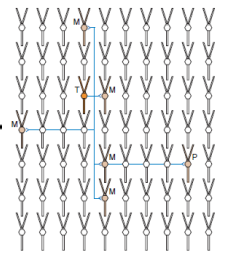
Daño de la barrera
hematoencefálica (BHE)
y resistencia a FAE⁴



Pérdida de densidad y
función de las espinas
dendríticas (estructuras
clave en los procesos
cognitivos y en el
estado afectivo)^{2,3}



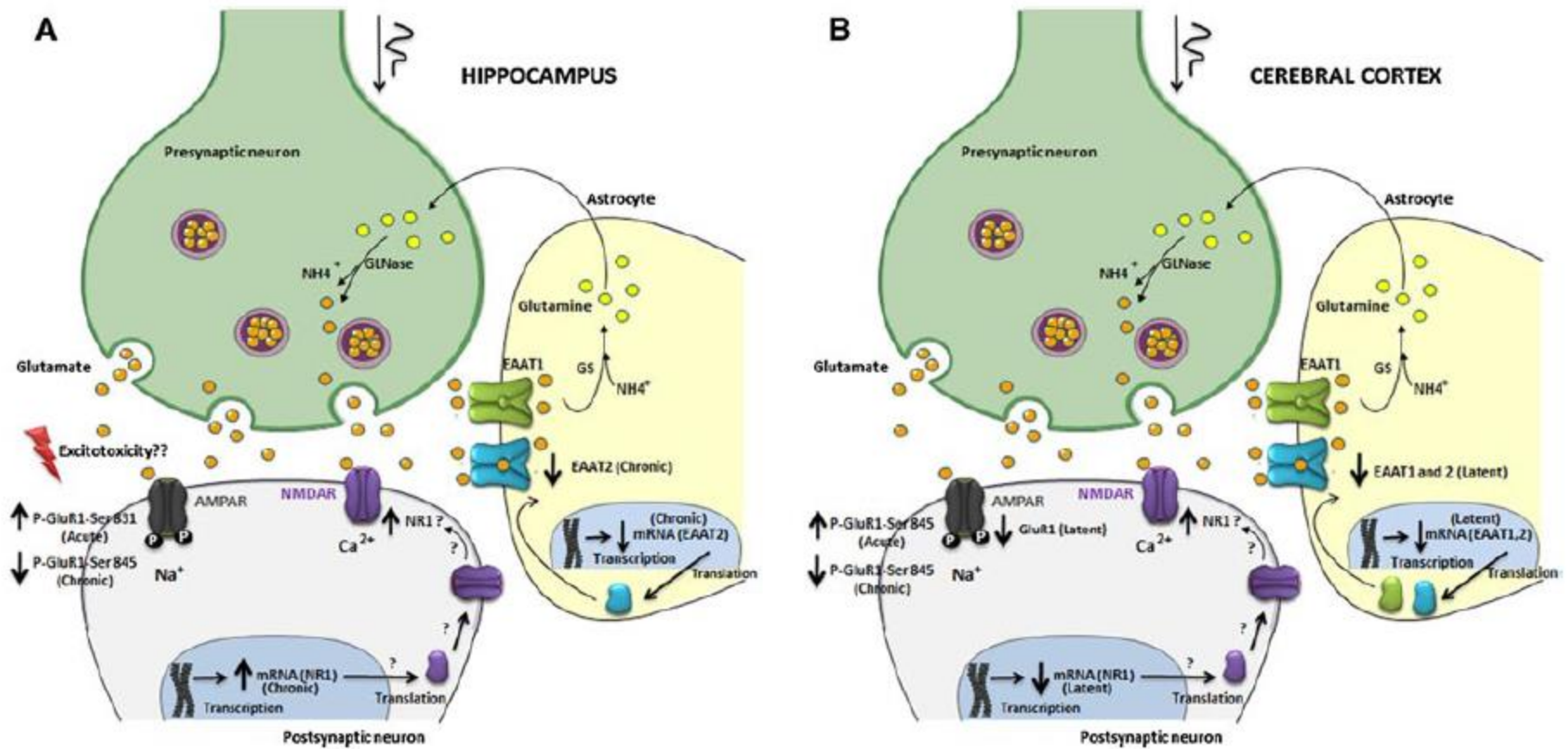
¹Meldrum BS. *Prog Brain Res* 2002;135:487–495; ²Elger. *Lancet Neurol* 2004, ³Wong. *Neuroscience* 2013, ⁴Liu et al. *Brain* 2012



AMPA Receptor Properties are Modulated in the Early Stages Following Pilocarpine-induced Status Epilepticus

Isabella Russo • Daniela Bonini • Luca La Via •
Sergio Barlati • Alessandro Barbon

- En modelo de status epiléptico inducido con pilocarpina se constatan cambios transcripcionales y traslacionales precoces en los receptores AMPA, especialmente en hipocampo.
- Esto podría ratificar el papel de las alteraciones de los receptores AMPA en la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica implicada en el inicio y la independización de la actividad epiléptica.



- El Glutamato liberado por las neuronas es recaptado del espacio extracelular a través de transportadores (Danbolt, 2001) y transformado en glutamina por la GS, presente en el citoplasma del astrocito (Martinez-Hernandez et al, 1977).

RECEPTORES AMPA Y GLUTAMATO

implicados en el daño neuronal inducido por las crisis

Crisis prolongadas

Liberación excesiva de glutamato

Activación receptores AMPA/NMDA

Entrada $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Activación enzimática
(proteasas, fosfolipasas,
sintetasas de óxido nítrico, endonucleasas)

Muerte celular neuronal excitotóxica

Meldrum-2002

Crisis menos graves

Liberación excesiva de glutamato

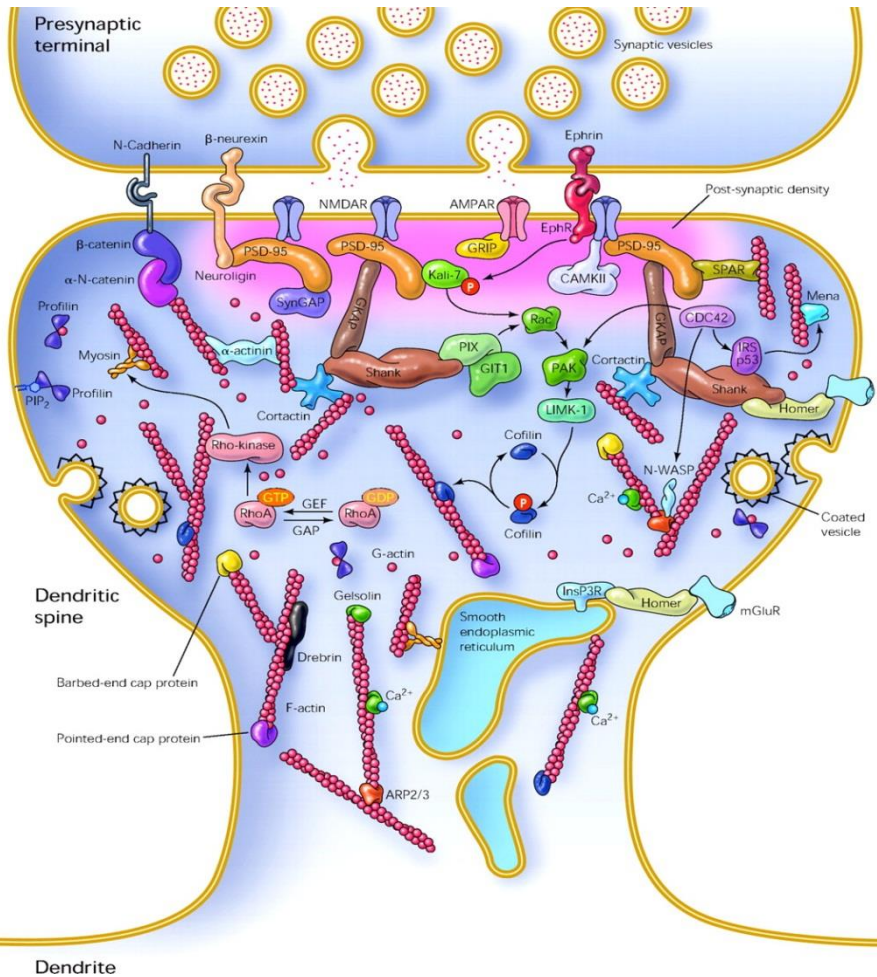
Activación receptores AMPA

Entrada $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Alteraciones en la actina y cadherina que
modifican forma y función de espinas
dendríticas.
Activación enzimática
(proteasas, fosfolipasas,
sintetasas de óxido nítrico, endonucleasas)

**Pérdida de función y número de
espinas dendríticas**

DISREGULACIÓN GLUTAMATÉRGICA ADQUIRIDA: daña a las espinas dendríticas y/o altera su movilidad



- Las espinas dendríticas en los focos epilépticos muestran cambios en su ramificación, movilidad y longitud, lo que podría asociarse a pérdida de eficiencia eléctrica y química en la neurotransmisión (influencia en aprendizaje y estado emocional).

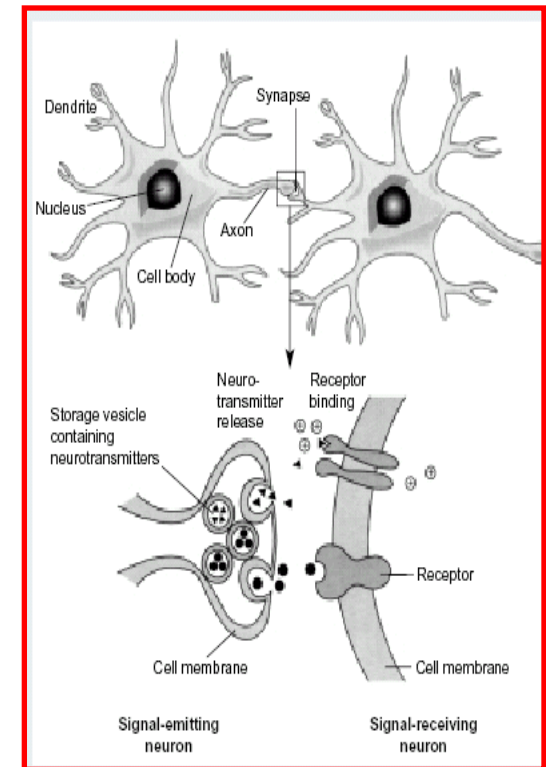
Elger-2004, Wong-2005

Glutamato y el daño al complejo BHE

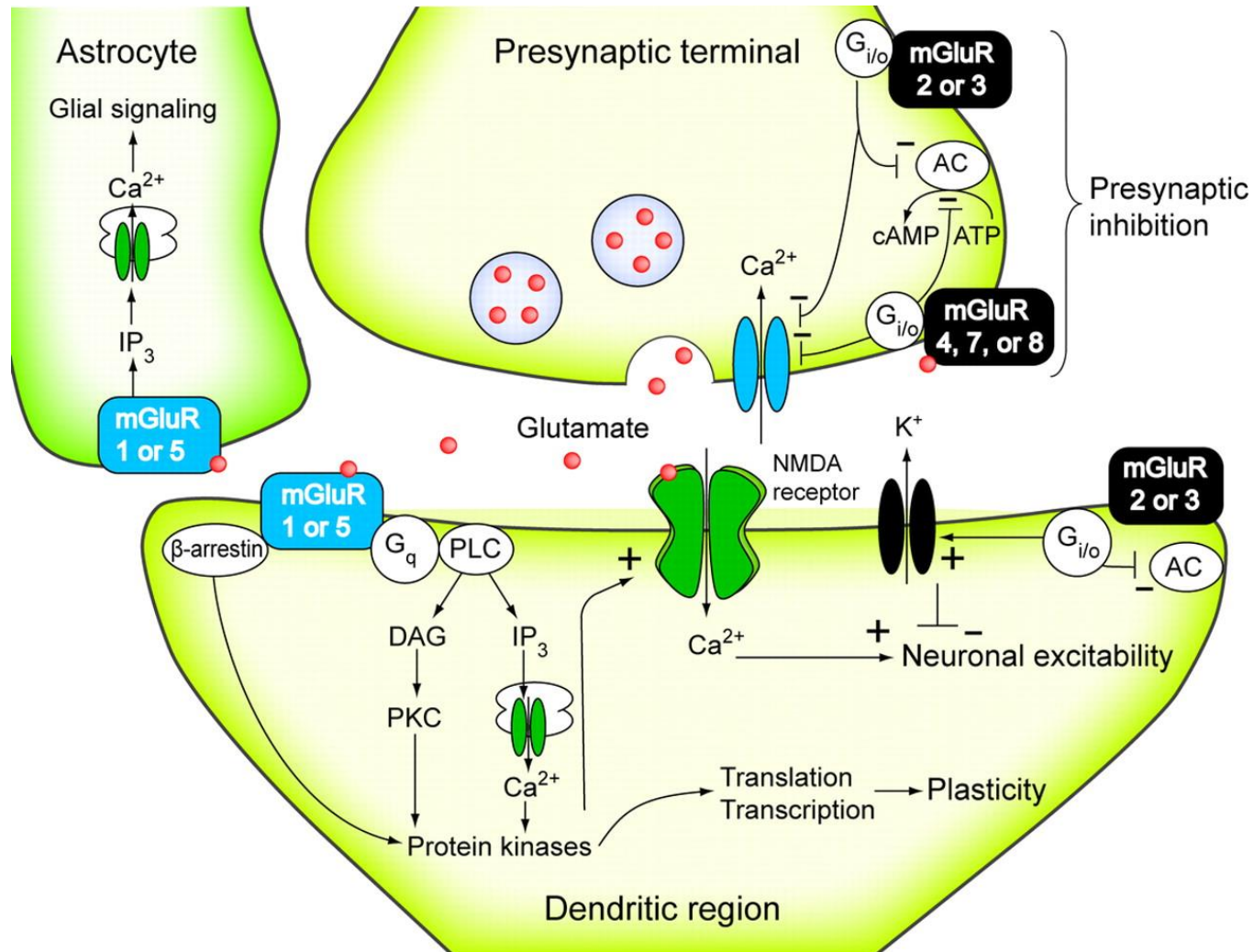
"endotelio-astrocitos-neuronas"

- Las Neuronas y los Astrocitos mantienen una estrecha relación mediada por **GLUTAMATO** y dicho circuito es fundamental en el microambiente sináptico.
- La administración de **ácido kaínico (KA)** induce la expresión de la sintasa 1 de prostaglandina E microsomal (**mPGES-1**) en las células endoteliales y del **receptor de prostaglandina E (EP3)** para prostaglandina E₂ (PGE₂) en los astrocitos.
- El **mPGES-1** endotelial **exacerba el daño neuronal inducido por KA in vivo**. In vitro , mPGES-1 produce PGE₂, que aumenta los niveles astrocitarios de Ca²⁺ a través del receptor EP3 e **incrementa la liberación de GLUTAMATO dependiente de Ca²⁺**, agravando así el daño neuronal.

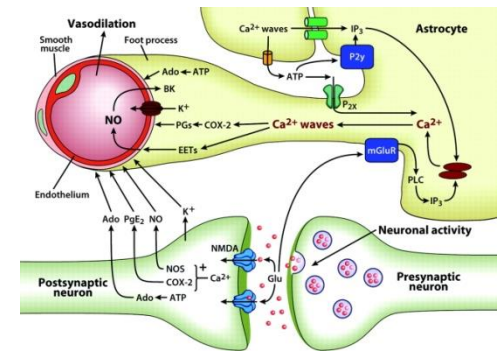
Esta vía de señalización endotelio-astrocito-neurona puede ser crucial para inducir el daño neuronal después de crisis repetidas y podría constituir una nueva diana terapéutica para la epilepsia y otros trastornos cerebrales.



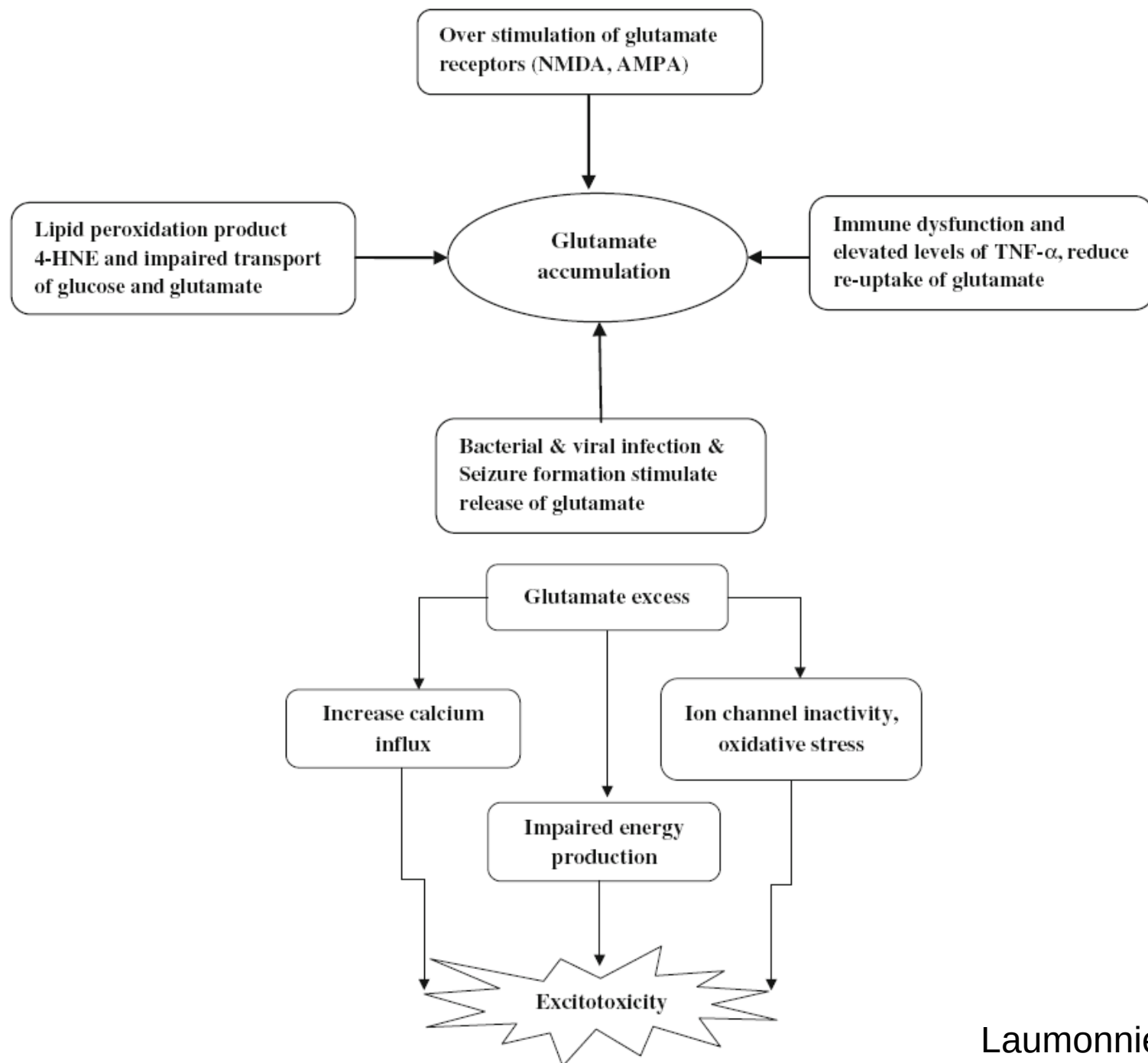
Excitotoxicidad en Autismo



Excitotoxicidad en el Autismo



- Papel de excitotoxicidad y stress oxidativo en TEA.
- Sobreestimulación neuronal vía glutamato y aspartato.
- Aumento de glutamato en autistas.
- Entrada anormal sodio, potasio y calcio en la neurona.
- Disregulación NMDAR y AMPAR $\rightarrow$ entrada calcio.
- Aumento NO y fosforilación proteinkinasa C.
- Activación fosfolipasa A $\rightarrow$ proinflamatoria.
- Radicales libres $\rightarrow$ daño redox mitocondrial.
- Excitotoxicidad $\rightarrow$ crisis epilépticas.
- Disbalance inhibición - excitación (GLU / GABA).



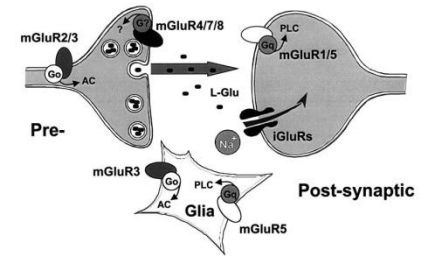
Glutamato y Neurodesarrollo

Modelos Animales de disfunción

ASD Model	Construct Validity	Face Validity: ASD core domains	Face Validity: ASD-associated symptoms domains	Evidence for disrupted glutamate receptor activity	References
<i>GluR6</i> ^{-/-} (GRIK2)	Candidate gene.		Decreased anxiety, reduced seizure susceptibility	KO directly removes a primary subunit of Kainate receptor type 2	(Fisahn et al., 2005; Malkeman et al., 2010; Shaluel et al., 2008)
<i>Fmr1</i> ^{-/-}	<i>Fmr1</i> expression is Disrupted in Fragile-X.	Social deficits.	Increase anxiety, and seizure susceptibility.	mGluR5 activity increased. Reduced NMDA receptor expression Disrupted AMPA receptor cycling. mGluR5 antagonist, and mGluR genetic reduction, reduce anxiety and seizure susceptibility.	(Eadie et al., 2010; Nakamoto et al., 2007; Westmark et al., 2009)
B TBR mouse		Social deficits, repetitive behavior.		Disrupted metabolism of the endogenous glutamate antagonist kynurenic acid MPEP efficacy in reducing stereotypes.	(McFarlane et al., 2008; Moy et al., 2008; Silverman et al., 2010a)
Prenatal valproic acid exposure (VPA model)	Analogous to prenatal VPA in humans	Social deficits.	Gamma-band EEG phenotypes associated with developmental and language delays	mGluR5 up-regulation MPEP efficacy increased NMDA activity.	(Gandal et al., 2010; Rinaldi et al., 2007; Schneider and Przewlocki, 2005)
<i>MECP2</i> ^{-/-}	Rett syndrome Models, <i>MECP2</i> expression reduced in ASD.	Social deficits, repetitive behavior.		Decreased excitatory transmission. Reduced NMDA expression.	(Chen et al., 2001; Guy et al., 2001; Maliszewska-Cyna et al., 2010; Santos et al., 2007)
<i>SHANK1</i> ^{-/-}	Candidate gene.	Social deficits.	Increased anxiety.	Excitatory synapse disruption. Reduced Excitatory transmission.	(Hung et al., 2008; Silverman et al., 2010b)
<i>SHANK3</i> ^{-/+}	Candidate gene.	Social deficits.		Excitatory synapse disruption. Reduced Excitatory transmission.	(Bozdagi et al., 2010)
<i>DLG-4</i> ^{-/-} (PSD95 analogue)	Candidate gene.	Social deficits.	Increased anxiety.	Excitatory synapse disruption MPEP reduces anxiety.	(Peyder et al., 2010)
<i>Neurexin-1α</i> ^{-/-}	Candidate gene.	Repetitive behavior.	Cognitive deficits.	Reduced excitatory transmission.	(Ehrston et al., 2009)
<i>Neuregulin-1</i> ^{-/-}	Candidate gene.	Repetitive behavior.	Cognitive deficits.	Reduced NMDA/AMPA ratio.	(Blundell et al., 2010)

Glutamato y TEA

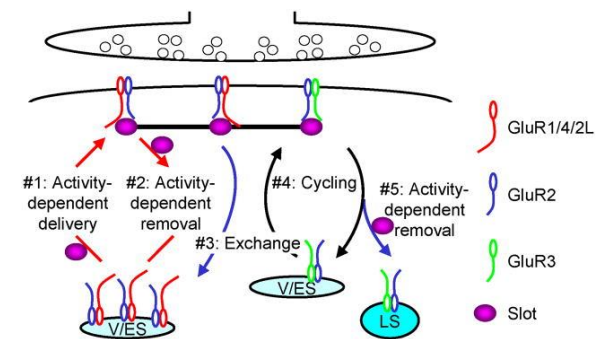
- Alteración redes sinápticas ligadas a GLU.
- Relación con desarrollo de epilepsia, ansiedad, y repertorio restringido de actividades e intereses en el TEA.
- Poca relación con las alteraciones de la interacción social recíproca de los TEA (¿neuroliquinas? ¿otros genes de sinaptogénesis?).
- Alteración plasticidad neuronal ligada a NMDAR.
- Alteración transducción de señal celular ligada a GLU-R-m.
- Alteración de la expresión del gen transportador de GLU en autistas y en animales de experimentación / modelos knock-out con rasgos TEA-like.
- Mutaciones del gen del receptor GRM6 (6q21) en autistas.
- Mutaciones del gen del receptor GRM8 (7q31-q33) en autistas.
- Modelo de disfunción GRM5 en ratón FMR -/- knock-out.
- Alteración cociente AMPAR / NMDAR.
- ¿Disfunción primaria o efecto indirecto de otros genes sobre GLUR.



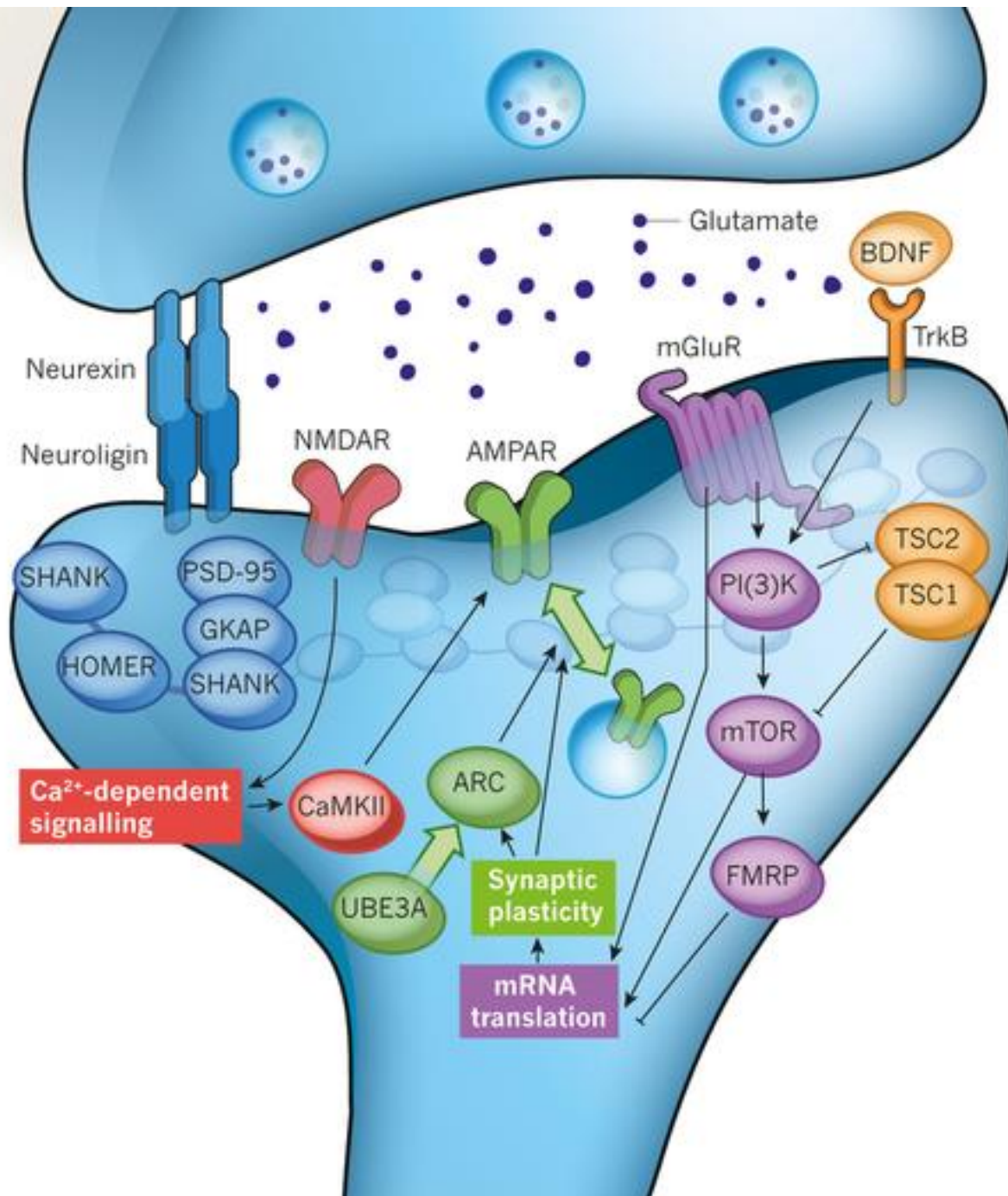
Receptores Glutamato AMPA

Neurodesarrollo

Sinaptogénesis



- Potencial papel de internalización de receptores AMPA en los trastornos del neurodesarrollo.
 - Relación con alteraciones gen SHANK3.
 - Relación con alteración Neuroliquinas.
 - Relación con alteración gen *islet brain 2* (IB2).
 - Relación con alteración cascada RAS.
 - Modelo ratón con FRAX y mGluRs y AMPAR.
 - Relación con la expresión de ARC en Angelman.
- Potencial diana terapéutica en epilepsia y autismo.



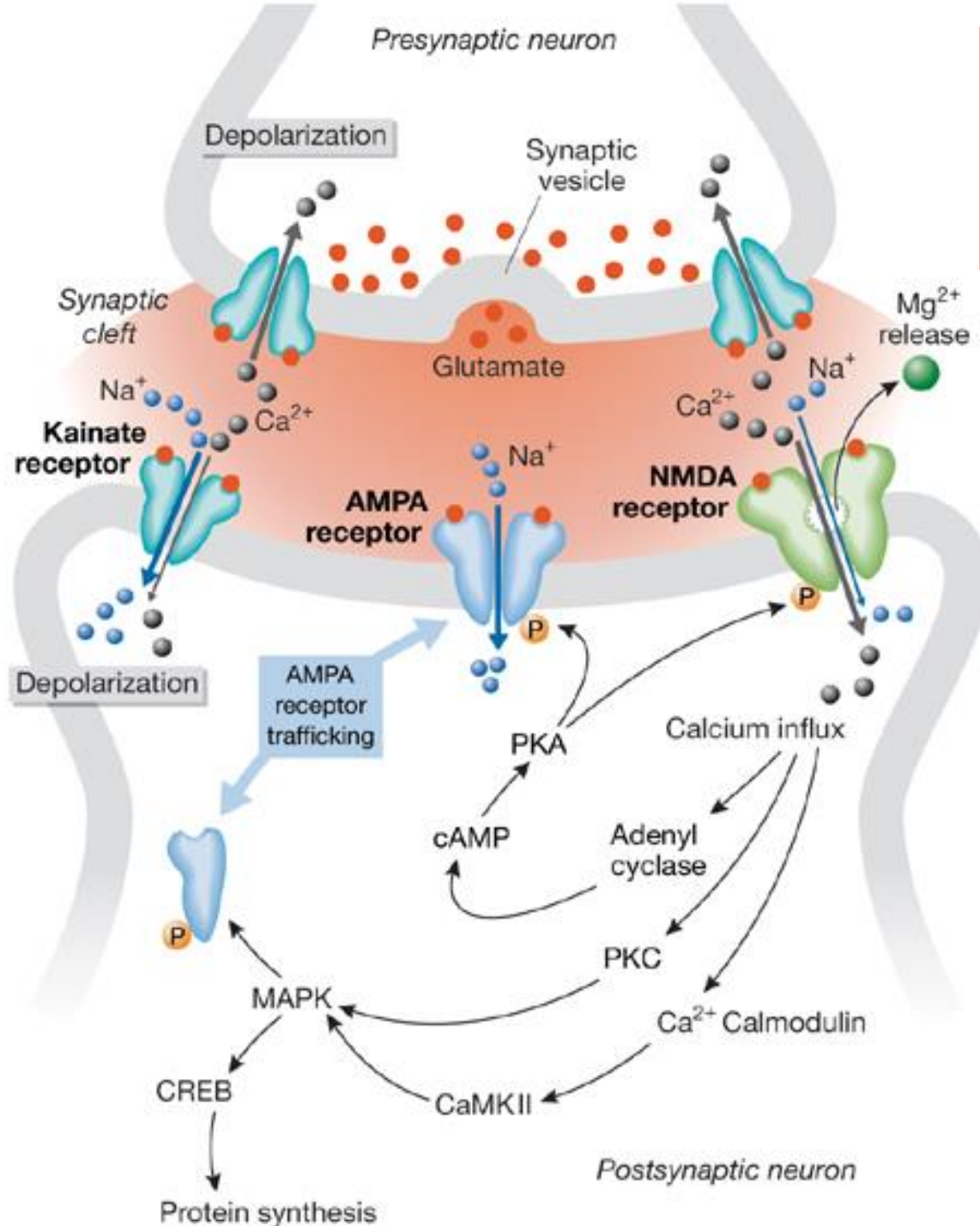
Papel
central
de
AMPA

Sinaptogénesis
Plasticidad Neuronal
Apoptosis
Reorganización redes

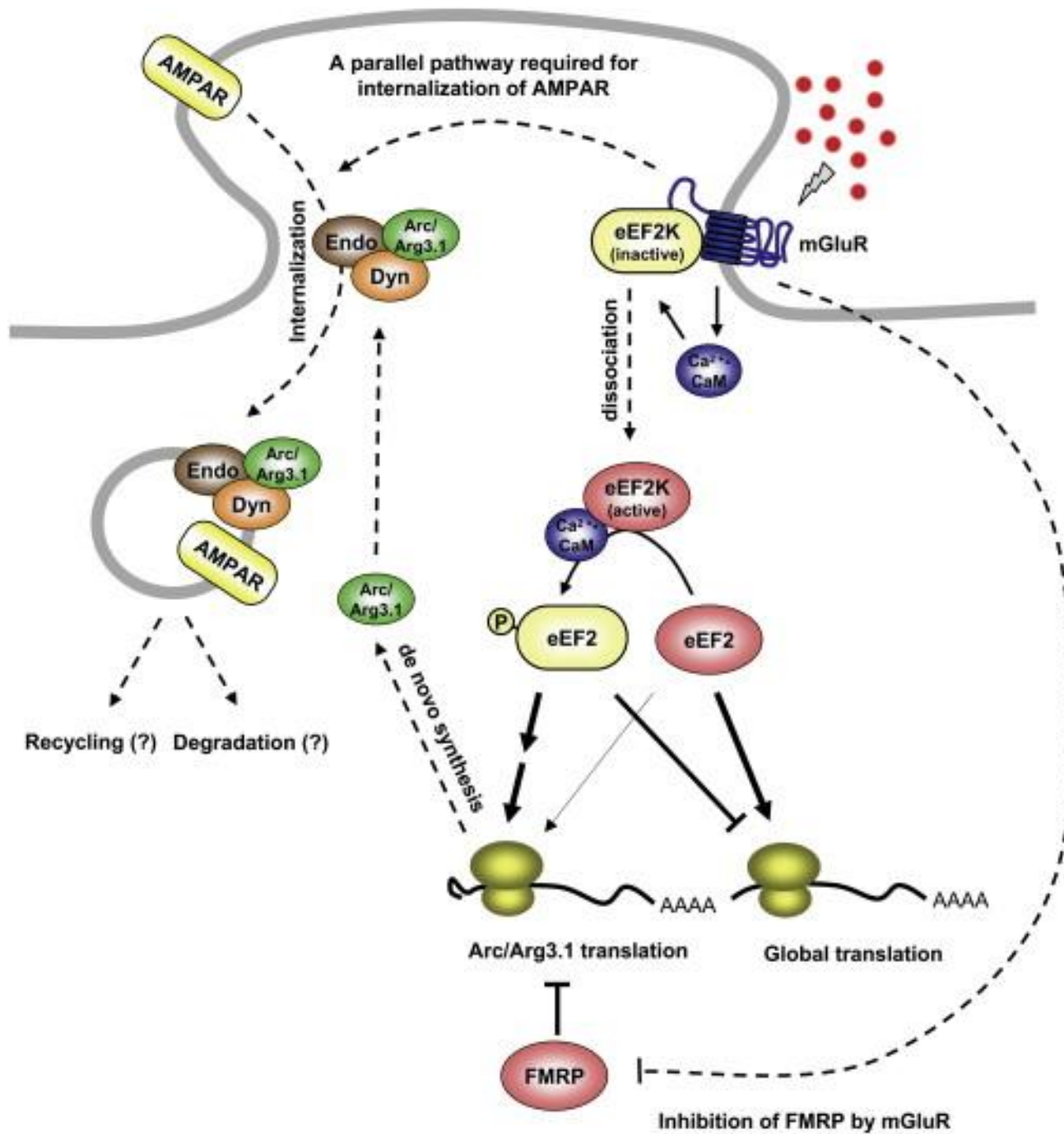


Epileptogénesis
Neuroprotección

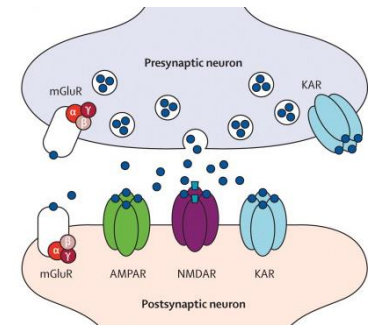
Tráfico de receptores AMPA



Papel
de
ARC
y
FMRP

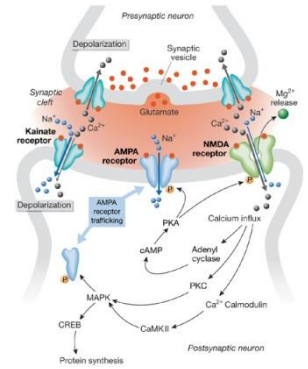


Receptores AMPA y TEA



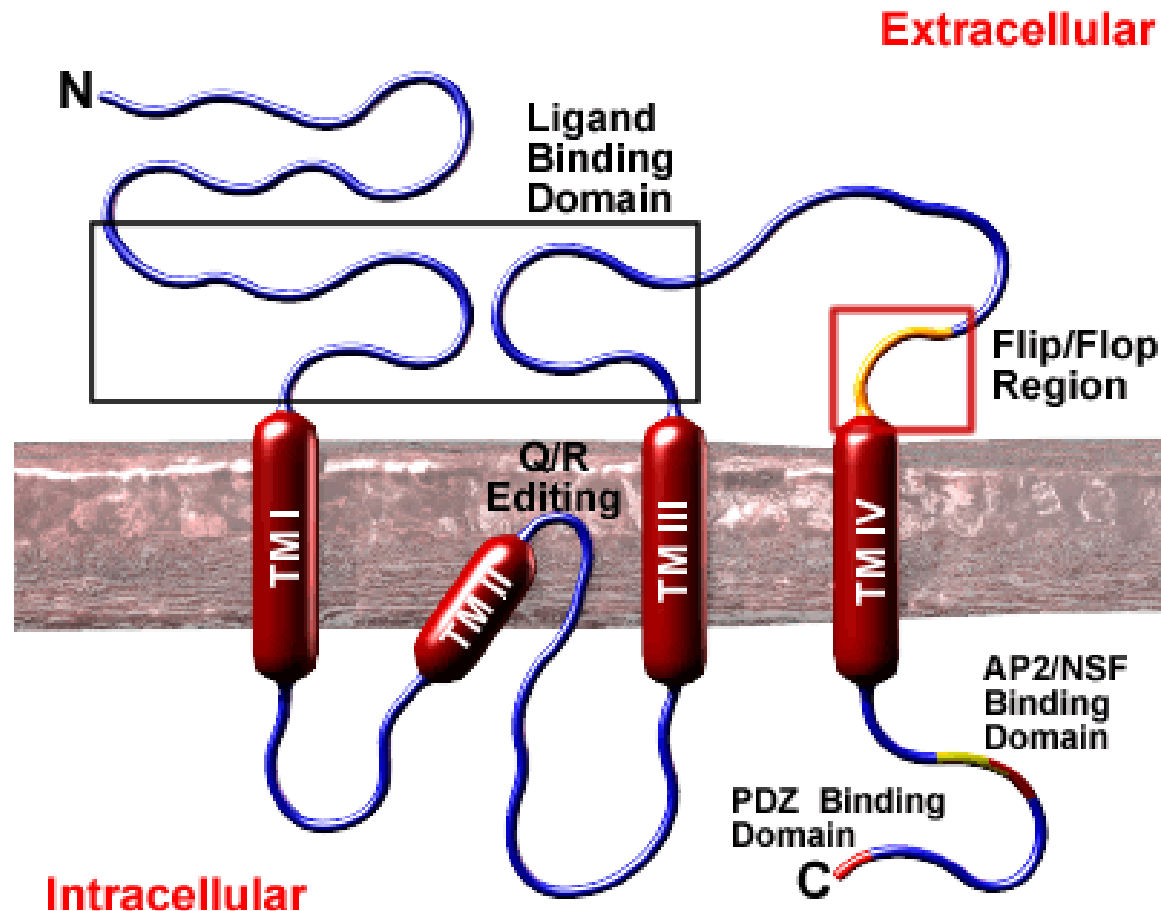
- Cambios en la expresión y tráfico celular de AMPAR.
- Alteración en la fosforilación de AMPAR.
- Alteración en síntesis y degradación de AMPAR.
- Disminución de expresión de subunidades GluA2 del AMPAR → mayor entrada de calcio neuronal.
- Interacción entre FMRP y AMPAR → disfunción AMPAR.
- Cerebelo, hipocampo, amígdala y córtex prefrontal.
- Reducción expresión AMPAR en cerebelo e hipocampo.
- Alteración de proteínas reguladoras endocitosis AMPAR (hipocampo y amígdala).

Receptores AMPA y TEA

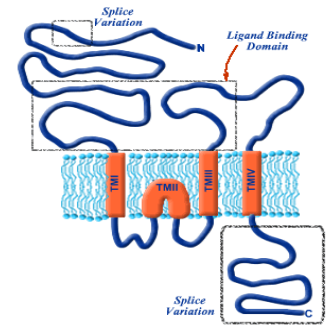


- Modelos monogénicos de animales Knock-out.
- Mutaciones en NLGN3 modulan, por defecto o por exceso, la función de AMPAR en el hipocampo.
- Mutaciones en NLGN3 potencian la fosforilación de la subunidad GluA2 S800 de AMPAR.
- Modelos FXS y delección Shank3 → reducción AMPAR.
- Modelos GRIP1/2 → exceso AMPAR.
- ¿Influencia factores ambientales?
- Fármacos:
 - Pirazetam como agonista alostérico de AMPAR.
 - Ampaquinas como agonistas de AMPAR.

¿Cómo se modulan los receptores AMPA?



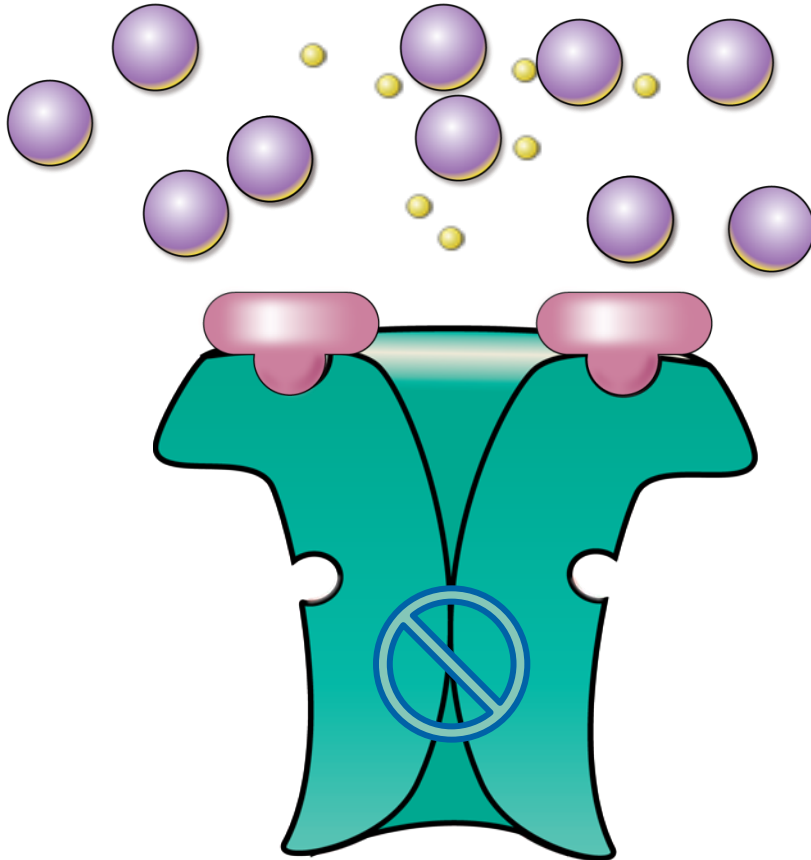
Antagonistas receptor AMPA



- **Amplio espectro antiepiléptico!!!!.**
- **Neuroprotectores!!!!**
- **Antagonistas competitivos:** sobre GLU en su punto de fijación al receptor
 - NBQX: riesgo alteraciones motoras y cristaluria.
 - Zonampanel: soluble, sedación, fase II.
 - ZK-200755: soluble, sedación, fase II.
 - NS-1209: soluble, pasa BHE, poca sedación, fase II, status.
- **Antagonistas no competitivos:** sobre sitio alostérico GYKI del receptor.
 - GYKI-52466: amplio espectro, escasa eficacia global.
 - Talampanel: amplio espectro, potencia VPA y PHT, cinética no lineal, CYP3A4, antiparkinsoniano, potencial en ELA, crisis parciales, fase II → fase III, somnolencia y cefalea. Baja eficacia global.
 - Perampanel: único antagonista no competitivo específico de AMPA con eficacia antiepiléptica comprobada y mantenida.

Antagonistas Competitivos de AMPA

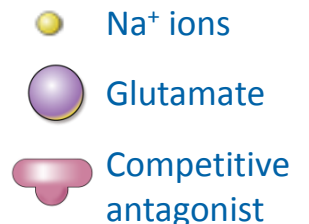
In the presence of a competitive antagonist



1. Glutamate cannot bind so cannot activate the receptor

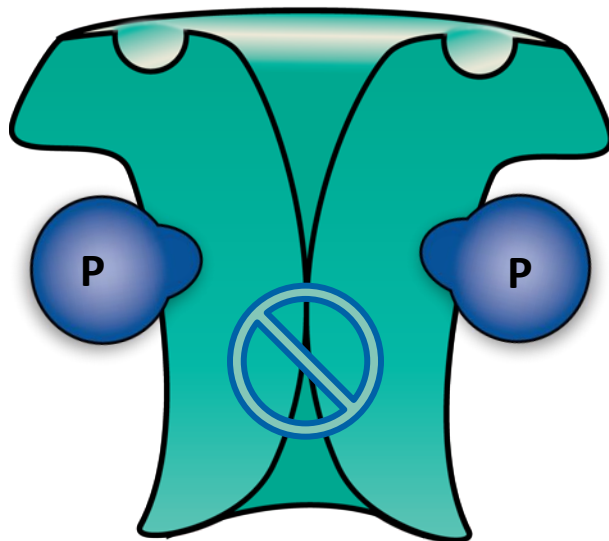
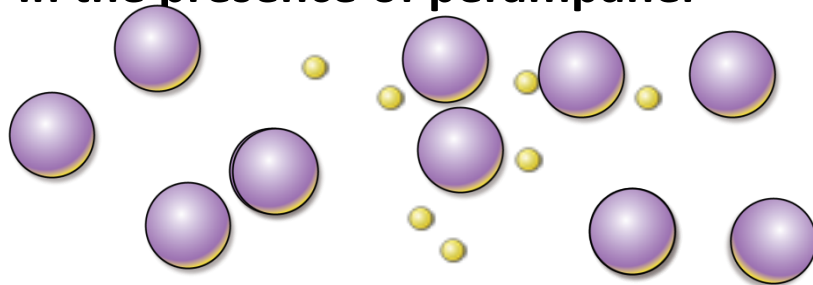
BUT when glutamate levels are high...

2. Glutamate displaces the antagonist...
3. ...binds to the receptor and activates it, opening the channel and allowing Na⁺ influx



Antagonistas No Competitivos de AMPA: Perampanel

In the presence of perampanel

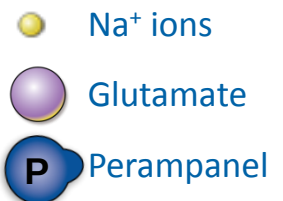


1. **Glutamate binds** but cannot activate the receptor¹

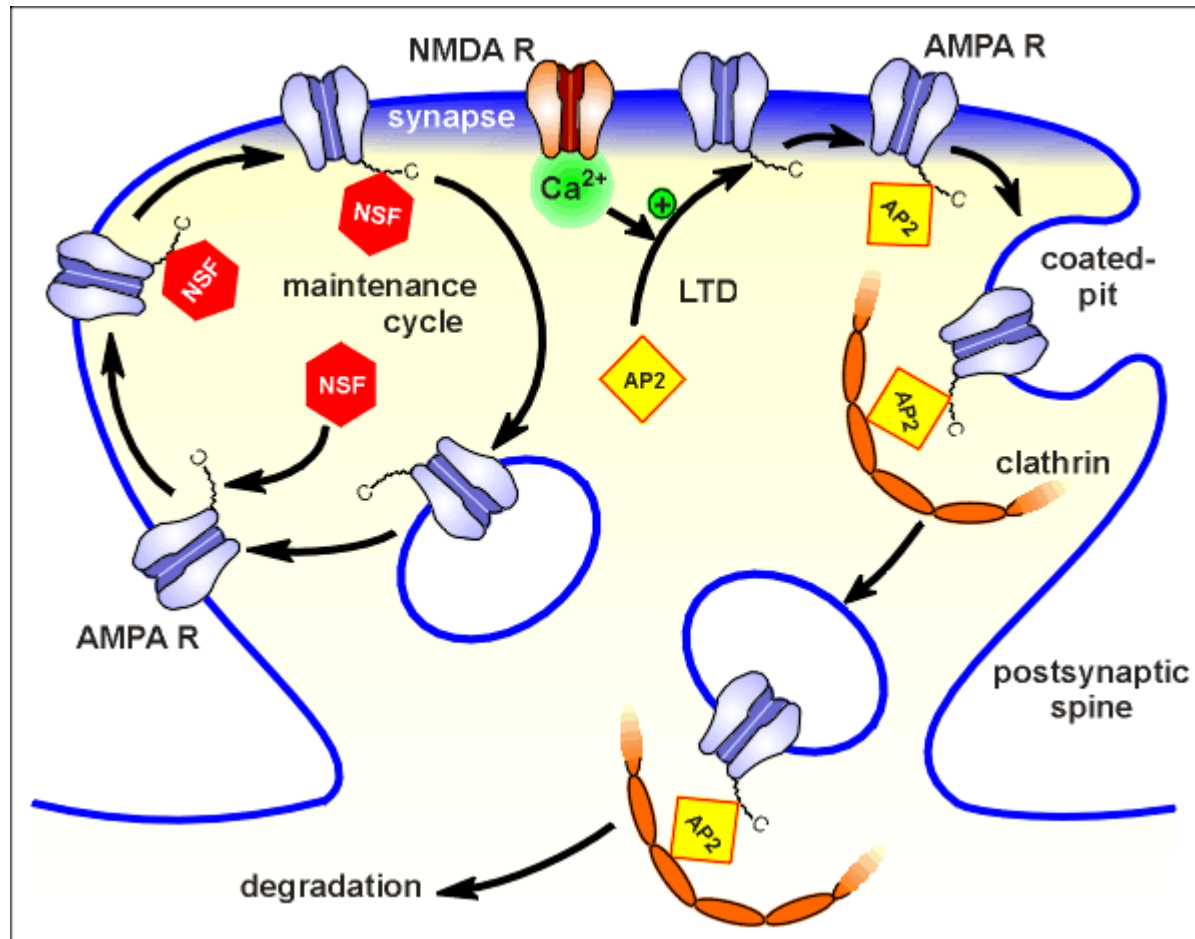
AND when glutamate levels are high...

2. ...non-competitive antagonist is not displaced by glutamate²

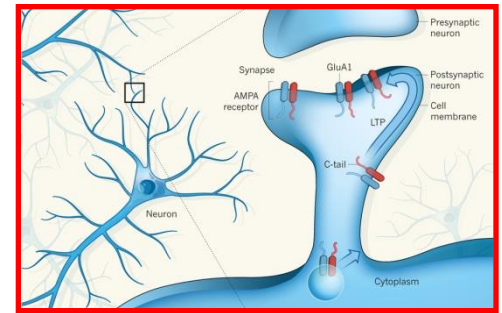
3. Receptor antagonism is maintained and the channel remains closed



PRP en el complejo Autismo-Epilepsia

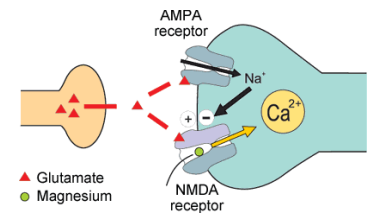


PRP en Autismo-Epilepsia



- N=5 pacientes con Autismo-Epilepsia.
- Edades: 6-14 años.
- Todos son varones.
- Todos con epilepsia focal frontal.
- Etiología sintomática en 3/5.
 - DCF en 2 y microdelección 11q en 1.
- FAE previos usados: 4-10.
- FAE concomitantes: 1-2 (CBZ, OXC, LEV, VPA, ZNS, CLB).
- Dosis de inicio: 1-2 mg/día.
- Aumentos de dosis cada 1-2 semanas. Dosis pauta: 4 mg.
- Dosis final: 4-12 mg/día.

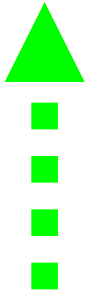
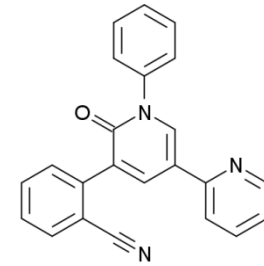
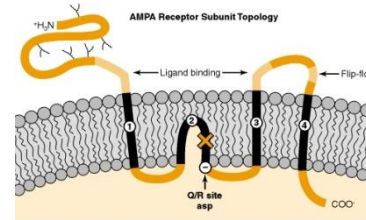
PRP en Autismo-Epilepsia



- Más de 6 meses de tratamiento con PRP.
- Respondedores (>50% reducción frecuencia crisis): 4/5.
 - Grupo global PRP: 50%
- Libres de crisis al menos 3 meses: 3/5.
 - Grupo global PRP: 14%
- Los 2 pacientes con DCF están libres de crisis.
- Mejores respuestas si se asocian OXC y/o ZNS.
- EAs en 4/5 pacientes.
 - Somnolencia (3), irritabilidad (4), agresividad (1).
 - Ninguna retirada por EAs.
 - Mejoría de EAs al ralentizar escalada y cantidad de dosis.
- Mejoría alerta y atención.
- No cambios en el "core" del TEA.

Perampanel (PRP)

Antagonista selectivo AMPA-R



- **PUNTOS FUERTES**

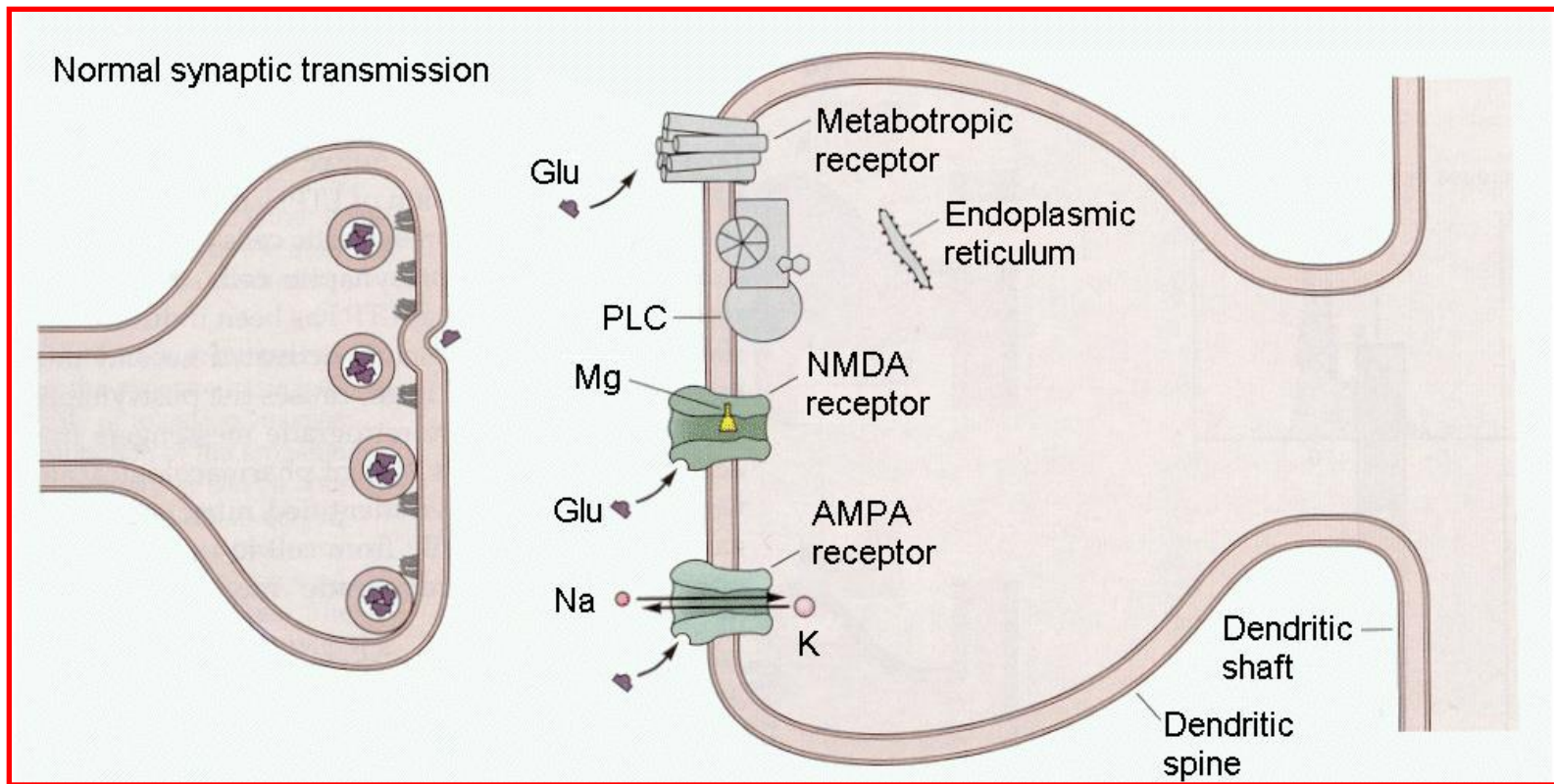
- Amplio espectro
- Epilepsias focales
- Cinética previsible
- Una sola toma al día
- EAs predecibles
- Amplia gama de presentaciones
- ¿Neuroprotector?
- ¿Antiepileptogénesis?

- **PUNTOS DÉBILES**

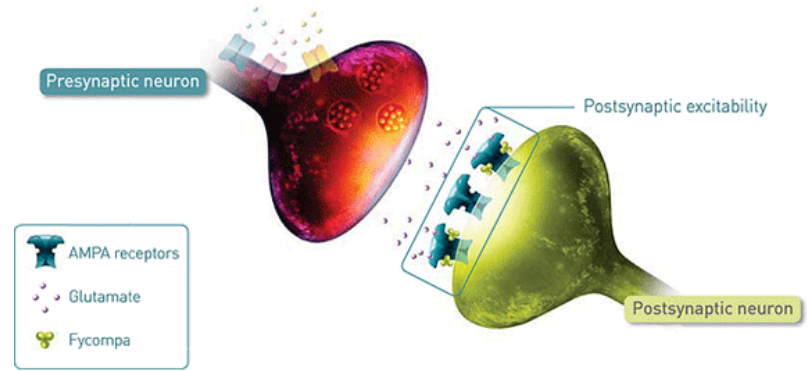
- Efectos adversos neurológicos
- Influido por FAEs inductores
- Escasa experiencia
- ¿Dosis pediátrica?

¿FAE para trastornos del neurodesarrollo?

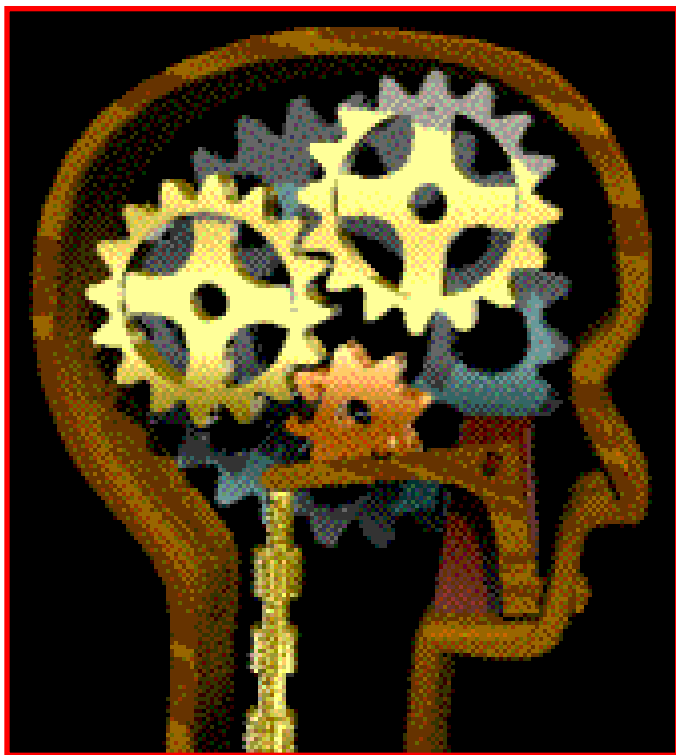
Conclusiones



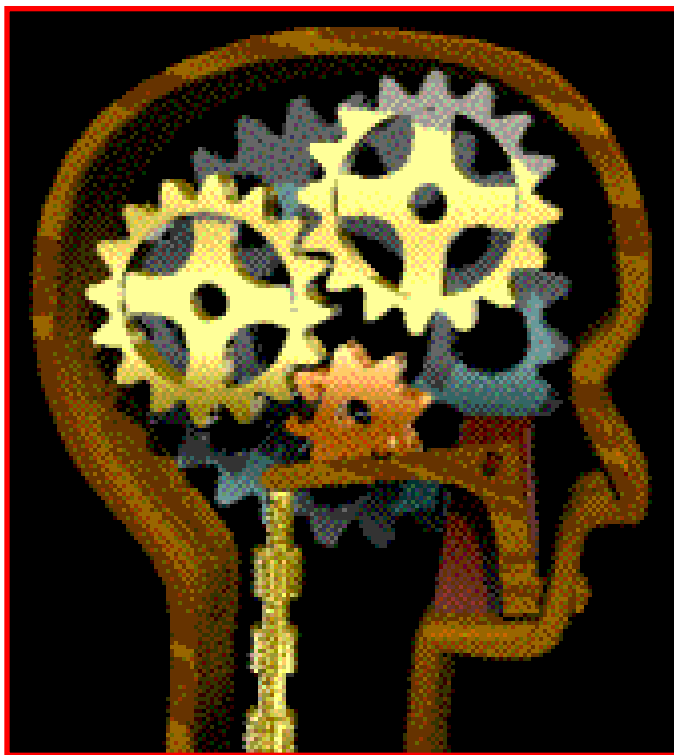
Conclusiones



- Autismo como patología excitotóxica.
- Importancia del glutamato y sus receptores.
- AMPA-R como regulador del neurodesarrollo.
- Potencial implicación en epileptogénesis.
- Modular AMPA-R → ¿Mejoría plasticidad sináptica?
- Utilidad PRP en el complejo autismo-epilepsia.
- ¿Tratamiento "a la carta" para autistas con epilepsia?
- ¿Cuál es la edad ideal para tratar con PRP?
- ¿Potencial utilidad en autismo aislado?



Perdemos el miedo a aquello que podemos comprender...



Perdemos el miedo a aquello que podemos comprender...

Gracias por vuestra atención