34

APORTACIONES DE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES A LA INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA BÁSICA

Albert Badia

monografías dr. antonio esteve

FUNDACIÓN DR. ANTONIO ESTEVE

APORTACIONES DE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES A LA INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA BÁSICA

Albert Badia

FUNDACIÓN DR. ANTONIO ESTEVE

©2008, Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera 2. E-08032 Barcelona
Teléfono: 93 433 53 20; fax: 93 450 48 99

Dirección electrónica: fundacion@esteve.org
Dirección URL: http://www.esteve.org

Depósito legal: B-17.634-08
ISBN: 978-84-936144-9-2

La Fundación Dr. Antonio Esteve contempla como objetivo prioritario el estímulo del progreso de la terapéutica por medio de la comunicación y la discusión científica.

La Fundación quiere promover la cooperación internacional en la investigación farmacoterapéutica y, a tal fin, organiza reuniones internacionales multidisciplinarias donde grupos reducidos de investigadores discuten los resultados de sus trabajos. Estas discusiones se recogen en las publicaciones de los Esteve Foundation Symposia.

Otras actividades de la Fundación Dr. Antonio Esteve incluyen la organización de reuniones dedicadas a la discusión de problemas de alcance más local y publicadas en el formato de la presente monografía. La Fundación participa también en conferencias, seminarios, cursos y otras formas de apoyo a las ciencias médicas, farmacéuticas y biológicas, y con carácter bienal concede un premio al mejor artículo publicado por un autor español dentro del área de la farmacoterapia.

Entre otras publicaciones cabe destacar la serie Pharmacotherapy Revisited: An Esteve Foundation Series, en la cual en diferentes volúmenes se recopilan, en edición facsímil, los principales artículos que sentaron las bases de una determinada disciplina. Más recientemente se ha iniciado la publicación de los Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve.

Tanto la introducción como los artículos y discusiones de la presente monografía recogen la opinión de los correspondientes autores, por lo que la Fundación Dr. Antonio Esteve no se hace necesariamente partícipe de su contenido. Los diferentes capítulos corresponden a las ponencias presentadas en la mesa redonda organizada por la Fundación Dr. Antonio Esteve en Sitges (Palau Maricel), el día 30 de noviembre de 2007, que estuvo moderada por Albert Badia.

Aportaciones de los estudios funcionales a la investigación farmacológica básica

A. Badia

Introducción IX

M.D. Ivorra y P. D'Ocón

Nuevos métodos funcionales para el estudio de la interacción fármaco-receptor 1

F. Orallo

Actividad vasodilatadora del *trans*-resveratrol en la aorta torácica aislada de rata: una clara evidencia de sus efectos cardioprotectores 13

A.M. Planas y E. Vila

La inflamación como diana terapéutica en la isquemia cerebral 27

M.J. Sanz

Nuevos modelos funcionales en inflamación. Aplicaciones en patología pulmonar 37

F. Pérez-Vizcaíno, A. Cogolludo y L. Moreno

Papel de los canales de potasio dependientes del voltaje, de la PKCζ y de las especies reactivas de oxígeno en la vasoconstricción pulmonar inducida por tromboxano A_2. Estudios funcionales frente a técnicas complementarias 47

M.J. Ramírez

Estudios funcionales en aprendizaje y memoria 55

J.A. Armijo y A. Cuadrado

Problemática de los estudios de las interacciones farmacodinámicas entre antiepilépticos 67

P. Robledo

Efectos cognitivos, motivacionales y neuroquímicos de la administración repetida de MDMA ("éxtasis") 89

M.I. Colado

Consecuencias funcionales inmediatas y a largo plazo de la administración de MDMA en roedores 97

C.M. Cendán

Estudios experimentales en dolor agudo e inflamatorio: el modelo de la administración intraplantar de formalina en el ratón 103

C. Goicoechea

Modelos animales de dolor neuropático: dolor inducido por antitumorales frente a manipulación de nervios periféricos 113

Relación de participantes

Bárbara Aisa
Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad de Navarra
Irunlarrea 1
31008 Pamplona

Antonia Arañó
Departamento de Farmacodinamia
RCC-CIDA, S.A.
Centro Industrial Santiga
Argenters 6
08130 Sta. Perpètua de Mogoda
Barcelona

Juan A. Armijo
Servicio de Farmacología Clínica
Hospital Universitario Marqués
de Valdecilla
Avda. de Valdecilla s/n
39008 Santander

Albert Badia
Departament de Farmacologia,
Terapèutica i Toxicologia
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Campus de Bellaterra. Edifici M
08193 Bellaterra, Cerdanyola

José Manuel Baeyens
Departamento de Farmacología
e Instituto de Neurociencias
Facultad de Medicina
Universidad de Granada
Avda. de Madrid 12
18012 Granada

Fèlix Bosch
Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera 2
08032 Barcelona

Javier Burgueño
Esteve I+D
Avda. Mare de Déu de Montserrat 221
08041 Barcelona

Cruz Miguel Cendán

Departamento de Farmacología
e Instituto de Neurociencias
Facultad de Medicina
Universidad de Granada
Avda. de Madrid 12
18012 Granada

Mª Isabel Colado

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Avda. de la Complutense s/n
28040 Madrid

Pilar D'Ocón

Departamento de Farmacología
Facultat de Farmàcia
Universitat de València
Avda. Vicent Andrés Estellés s/n
46100 Burjassot, València

Sergio Erill

Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera 2
08032 Barcelona

Andrés G. Fernández

Dirección I+D Preclínica
Laboratorios Salvat
Gall 30-36
08950 Esplugues de Llobregat
Barcelona

Carme Franquelo

Departamento de Farmacodinamia
RCC CIDA, S.A.
Centro Industrial Santiga
Argenters 6
08130 Sta. Perpètua de Mogoda
Barcelona

Amadeu Gavaldà

Farmacología General
I+D Almirall
Laureà Miró 408
08980 St. Feliu de Llobregat
Barcelona

Jesús Giraldo

Grup Biomatemàtic de Recerca
Institut de Neurociències
i Unitat de Bioestadística
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Campus de Bellaterra. Edifici M
08193 Bellaterra, Cerdanyola

Carlos Goicoechea

Área de Farmacología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Rey Juan Carlos
Avda. de Atenas s/n
28922 Alcorcón, Madrid

Mª Dolores Ivorra

Departamento de Farmacología
Facultat de Farmàcia
Universitat de València
Avda. Vicent Andrés Estellés s/n
46100 Burjassot, València

Jesús Llenas

Farmacología General
I+D Almirall
Laureà Miró 408
08980 St. Feliu de Llobregat
Barcelona

Francisco Orallo

Departamento de Farmacología
Facultad de Farmacia
Universidad de Santiago
de Compostela
Campus Universitario Sur
15782 Santiago de Compostela

Francisco Pérez-Vizcaíno

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
28040 Madrid

Anna Mª Planas

Institut d'Investigacions Biomèdiques
de Barcelona-Consejo Superior
de Investigaciones Científicas,
Institut d'Investigacions Biomèdiques
August Pi Sunyer (IDIBAPS)
Rosselló 161, planta 6
08036 Barcelona

María Javier Ramírez

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad de Navarra
Irunlarrea 1
31008 Pamplona

Patricia Robledo

Laboratorio de Neurofarmacología
Universitat Pompeu Fabra e Instituto
Municipal de Investigación Médica
Dr. Aiguader 88
08003 Barcelona

Laia Rosich

Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera 2
08032 Barcelona

Eduardo Salas

Dirección I+D
Gendiag
Juan de Sada 32
08028 Barcelona

Joan Sallés

Departamento de Farmacología
Facultad de Farmacia
Universidad del País Vasco
Paseo de la Universidad 7
01006 Vitoria

María Jesús Sanz

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad de Valencia-EG
Avda. Blasco Ibañez 15-17
46010 Valencia

José Miguel Vela

Esteve I+D
Avda. Mare de Déu de Montserrat 221
08041 Barcelona

Elisabet Vila

Departament de Farmacologia,
Terapèutica i Toxicologia
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Campus de Bellaterra. Edifici M
08193 Bellaterra, Cerdanyola

Introducción

La Farmacología como ciencia biológica se define, en sentido amplio, como la materia que estudia las acciones y los efectos, o mejor dicho las modificaciones funcionales, de los fármacos en los organismos vivos tanto sanos como enfermos. Según el nivel de estudio considerado se habla de Farmacología fisiológica, bioquímica o molecular. Aunque el sitio final de la acción farmacológica son las estructuras moleculares, ello no quita interés al estudio de otros niveles de integración tales como células, órganos o sistemas. Realmente, el fármaco, en su estadio más avanzado, va destinado a un organismo íntegro con la finalidad de curar o alterar voluntariamente una función para inducir efectos terapéuticos o, lo que es lo mismo, la inducción de los efectos en presencia de la enfermedad. Si bien el trabajo de Paul Ehrlich, a principios del siglo XX, estuvo determinado por dos principios, la fijación selectiva de sustancias a determinados grupos celulares y el hecho de que modificaciones químicas de las moléculas permitían aumentar su actividad biológica, su estrategia experimental se centró en el estudio de fármacos en enfermedades humanas reproducidas en animales. Con ello ya vemos que en los tiempos iniciales del desarrollo de la Farmacología existía la diferenciación de dos tipos de estudios en Farmacodinamia: por un lado, la determinación de las acciones de los fármacos sobre sustratos moleculares, o el estudio de los mismos a un nivel integrado mayor, como puede ser el organismo vivo, normal o enfermo, o en órganos o tejidos aislados. Por descontado, la elección del mejor sistema para evaluar los fármacos dependerá de la información que se precise en cada momento. Por lo general, el objetivo de muchos experimentos farmacológicos es predecir las respuestas integradas en el hombre a un fármaco, al más bajo coste posible con respecto a su dispendio en esfuerzo y recursos, así como la máxima precisión o ajuste de los resultados. Los tipos de estudios pueden variar desde los más simples (medidas bioquímicas sobre receptores en fragmentos de membrana) a los más complejos (experimentos *in vivo* en animales con mecanismos reflejos intactos). Por descontado, para el clínico, el sistema más complejo va a ser el óptimo, porque los efectos de los mecanismos neuronales, hormonales y reflejos autorreguladores son importantes para el conocimiento de los efectos clínicos globales de los fármacos. Sin embargo, en los años recientes, el gran desarrollo, especialmente de la Bioquímica, la Biología molecular y la Inmunología, ha permitido evolucionar el conocimiento hacia la acción de los fármacos sobre los sustratos moleculares biológicos más elementales, y ayudar al diseño y la síntesis de nuevos compuestos químicos más específicos y cercanos a los factores causales de los distintos procesos patológicos hasta ahora inabordables. Pero la hipertrofia de este tipo de estudios ha sido en detrimento de aquellos otros de tipo funcional que, como hemos comentado, nos acercan más a la realidad fisiológica. Su complejidad, en cambio, en términos de determinar los efectos primarios de los fármacos, no sólo puede ser costosa desde el punto de vista de recursos sino también incompleta por su falta de precisión. Esto puede deberse a varios problemas que se asocian a los estudios en la experimentación *in vivo*, sobre todo farmacocinética, mecanismos reflejos, etc., que pueden modular, potenciar o, de otra forma, oscurecer la respuesta primaria. A pesar de estas limitaciones, la elección de los estudios

funcionales *in vivo* o *in vitro* continúa siendo la base de la Farmacología como ciencia, y nos va a permitir determinar algo tan consustancial a ella como es la relación entre la dosis o la concentración y la respuesta, para determinar parámetros farmacométricos, analizar la potencia de los fármacos y establecer comparaciones entre ellos.

La finalidad de la presente reunión ha sido analizar el valor actual de distintos estudios farmacológicos realizados mediante técnicas funcionales *in vivo* o *in vitro*, para poner de relieve su interés en la determinación del perfil de actuación de moléculas químicas y para el conocimiento de su mecanismo de actuación y su hipotética aplicación terapéutica posterior, que a la par son los grandes objetivos de la Farmacología.

Finalmente, es obligado agradecer a la Fundación Dr. Antonio Esteve la realización de esta reunión, que ha permitido el intercambio de conocimientos entre distintos grupos de investigación en nuestro país y remarcar la importancia de los estudios funcionales en el desarrollo de la Farmacología como ciencia biológica.

Albert Badia
Diciembre de 2007

Nuevos métodos funcionales para el estudio de la interacción fármaco-receptor

M.D. Ivorra y P. D'Ocón
Departamento de Farmacología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Resumen: *El protocolo experimental más utilizado para establecer la potencia funcional de los antagonistas, el descrito por Arunlakshana y Schild, implica la elaboración de curvas concentración-respuesta del agonista en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones del antagonista. Este método requiere utilizar un gran número de animales de experimentación, junto con una gran dedicación de tiempo por parte del investigador para realizar los experimentos y el cálculo de los resultados. Por ello, planteamos un método que, de forma más sencilla y rápida, nos permita determinar la potencia de los antagonistas. Basándonos en la capacidad del antagonista competitivo para revertir la acción del agonista, en el método propuesto el antagonista se añade en concentraciones acumulativas crecientes después de haber dejado actuar al agonista a concentraciones máximas. Se elaboran curvas concentración-"respuesta" del antagonista y a partir de ellas se calcula el valor de* pCI_{50} *(log negativo de la concentración de antagonista que produce el 50% de inhibición del efecto del agonista), que define la potencia del antagonista, y la pendiente (p) que nos indica el tipo de interacción. Comparando ambos métodos se demuestra que existe una equivalencia entre los valores de* pCI_{50} *y* pA_2/pK_B*. Se destaca la utilidad del nuevo método para caracterizar la población de receptores presentes en un territorio, evidenciar variaciones en la funcionalidad de los receptores en diferentes enfermedades y caracterizar nuevos compuestos selectivos de dichos receptores.*

Palabras clave: Interacción fármaco-receptor – Potencia de antagonistas – Método de Schild – Adrenoceptores α_1 – Adrenoceptores β.

Introducción

La caracterización farmacológica de la interacción ligando-receptor incluye la determinación de la "afinidad" del ligando por el receptor, parámetro que se obtiene mediante estudios de unión de radioligandos, y la determinación de la "potencia" del ligando, para lo que se realizan estudios funcionales en los que, además de definir la actuación del ligando como "agonista" o "antagonista", se calcula un parámetro que nos permita dar una medida matemática de dicha potencia. En el caso de los agonistas, este parámetro es el pD_2 o pCE_{50}, definido como el logaritmo negativo de la concentración de agonista capaz de producir el 50% de la respuesta máxima. Para determinarlo, se elaboran curvas concentración-respuesta (CCR) con dosis acumulativas del agonista, crecientes en progresión geométrica. El ajuste matemático de la sigmoidea obtenida cuando se hace la transformación logarítmica de la concentración nos permite el cálculo de la pCE_{50} (Fig. 1A). El método más utilizado para establecer la potencia de un antagonista es el descrito por Arunlakshana y

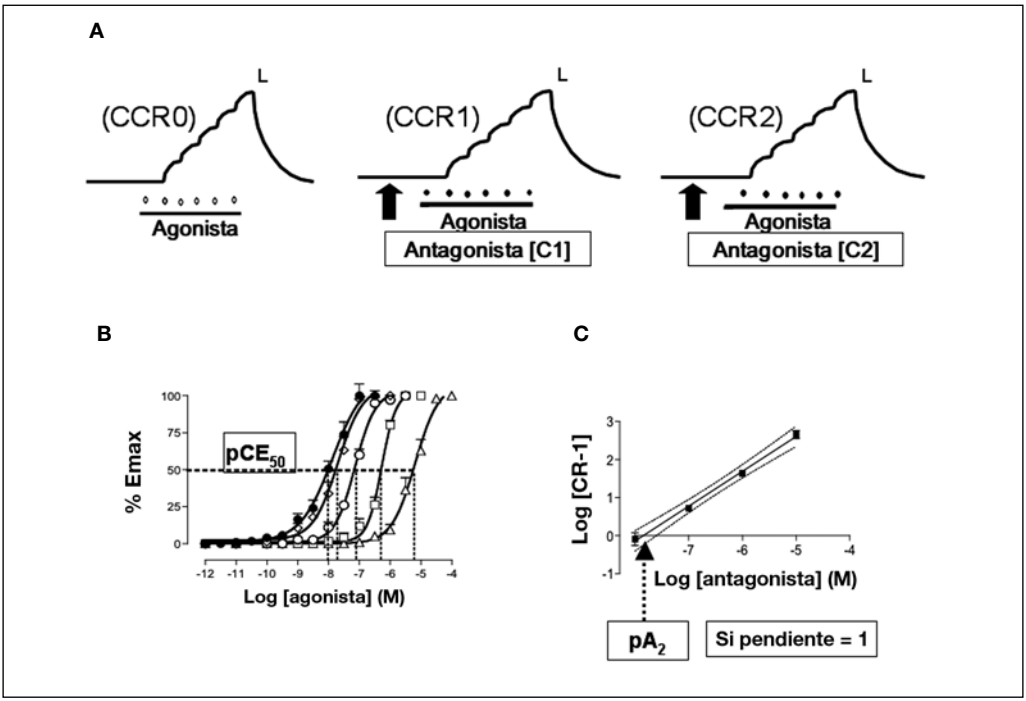


Figura 1. Esquema representativo del método de Schild. (A) Protocolo experimental que consiste en la realización de curvas concentración-respuesta (CCR) del agonista en ausencia (0) y presencia (1, 2...) de distintas concentraciones del antagonista (C1, C2...). (B) Representación gráfica de las CCR obtenidas y cálculo de la pCE_{50} después de realizar su ajuste a una sigmoidea. (C) Representación gráfica de la recta de Schild para el cálculo del pA_2.

Schild,[1] que implica la elaboración de curvas CCR del agonista en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones del antagonista (Fig. 1B). A partir de estas curvas se calcula la CE_{50} del agonista en ausencia y en presencia de las distintas concentraciones del antagonista, y con ellas se determina la razón de concentraciones:

$$CR = \frac{CE_{50} \text{ en presencia de antagonista}}{CE_{50} \text{ en ausencia de antagonista}}$$

La recta dada por la ecuación log (CR-1) = log [B] – log K_B se denomina recta de Schild (Fig. 1C), y en ella [B] es la concentración de antagonista empleada y el término pK_B coincide con el valor de –log [B] cuando CR es igual a 2. Esta recta permite determinar la naturaleza competitiva del antagonismo (si tiene una pendiente cercana a la unidad) y calcular la potencia del antagonista al obtener una estimación funcional de la constante de afinidad del antagonista por el receptor: –log K_B= (pK_B), que representa la intersección de la recta de Schild con el eje de abscisas. Cuando la pendiente de la recta es la unidad, este valor de pK_B corresponde al valor de pA_2, parámetro empírico que utilizamos para definir la potencia del antagonista.

Según el método de Arunlakshana y Schild,[1] para poder determinar la potencia, expresada como pA_2, es necesario realizar diferentes CCR del agonista en ausencia y en presencia de al menos tres o cuatro concentraciones de antagonista, lo cual, si se realiza en un único experimento, supone una gran inversión de tiempo. Si además tenemos en cuenta los fenómenos de sensibilización o taquifilaxia de los recep-

tores, en muchas ocasiones resulta necesario utilizar diferentes muestras biológicas para realizar cada una de las CCR, lo que a su vez implica la utilización de un elevado número de animales de experimentación. A todo ello hay que añadir el tiempo que posteriormente se emplea para la medida de las curvas y su análisis matemático. Este alto coste en tiempo y animales es especialmente relevante cuando se realizan experimentos de cribado de nuevos productos, cuando se quiere caracterizar la población de receptores funcionalmente activa en diferentes territorios y cuando se quieren analizar cambios en la funcionalidad de los receptores derivados de una situación patológica, especialmente si estos cambios se van a analizar en muestras humanas.

Para simplificar esta cuestión en los estudios funcionales en baño de órganos, planteamos un nuevo método que nos permite determinar la potencia de un antagonista mediante un desarrollo experimental más sencillo y rápido que el descrito, y que supone, además, una considerable reducción en el número de muestras a utilizar. El esquema del protocolo utilizado para este nuevo método se mues-

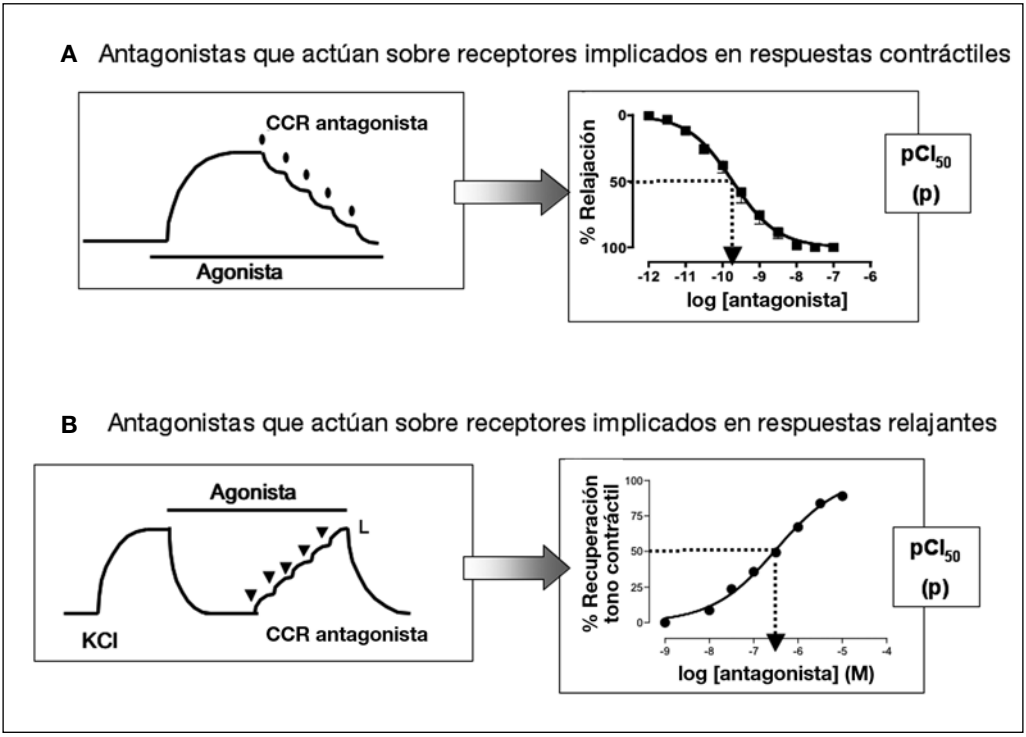


Figura 2. Esquema representativo del nuevo método propuesto en dos situaciones experimentales distintas. (A) Antagonistas que actúan sobre receptores implicados en respuestas contráctiles. Sobre la meseta estable de contracción inducida por el agonista, se añaden concentraciones acumulativas crecientes del antagonista, lo que origina una inhibición del tono contráctil dependiente de la concentración. Se construye la CCR y se realiza el ajuste a una sigmoidea, calculando la pCI_{50} y la pendiente (p). (B) Antagonistas que actúan sobre los receptores implicados en las respuestas relajantes. Sobre un tono contráctil estable obtenido por despolarización de la membrana se añade el agonista hasta inhibir completamente dicho tono. A continuación, y en presencia del agonista, se realiza la adición de concentraciones acumulativas crecientes del antagonista que, al revertir la acción del agonista, da lugar a recuperaciones del tono contráctil previo dependientes de la concentración. Como en el caso anterior, se realiza la CCR y se calculan la pCI_{50} y la pendiente (p).

tra en la Fig. 2, y aunque conceptualmente se basa en el mismo principio, la capacidad del antagonista para revertir la acción del agonista, técnicamente exige un protocolo experimental diferente según se trate de sistemas receptores que median respuestas contráctiles (Fig. 2A) o relajantes (Fig. 2B). En ambos casos, la principal diferencia entre el nuevo método y el tradicional de Schild estriba en el agente con que se elaboran las CCR y en el orden en que se añaden agonista y antagonista. En el método de Schild, el antagonista se añade antes que el agonista y las CCR siempre se elaboran con el agonista. En el nuevo método, el antagonista se añade después de haber obtenido una respuesta máxima y sostenida del agonista, y la CCR se elabora con el antagonista. Cuando el agonista induce una respuesta contráctil (Fig. 2A), sobre la meseta estable de contracción se añaden concentraciones acumulativas crecientes del antagonista, obteniéndose una CCR de relajación. Cuando el agonista induce una respuesta relajante, el protocolo es algo mas complejo (Fig. 2B) porque es necesario establecer un tono contráctil previo, por ejemplo por despolarización con KCl, para inducir, sobre este tono, una relajación máxima con el agonista y a continuación añadir concentraciones acumulativas crecientes del antagonista tratando de revertir esa relajación y recuperar el tono inicial.

El objetivo del presente trabajo es demostrar que con este método podemos obtener unos parámetros equivalentes a los del método clásico de Schild: pCI_{50} (log negativo de la concentración de antagonista que produce el 50% de inhibición del efecto del agonista) equivalente al pA_2 y pendiente (p) de la CCR del antagonista equivalente a la pendiente de la recta de Schild. El cálculo de ambos parámetros se realiza a partir del ajuste matemático de la CCR del antagonista.

Material y métodos

Para la puesta a punto del nuevo método hemos caracterizado la población de adrenoceptores (AR) α_1 y β presente en diferentes territorios de rata, como preparaciones de vasos (arteria caudal, aorta) y tejido intestinal (colon, íleon) ricos en AR α_1 y β_3, respectivamente.[2-8]

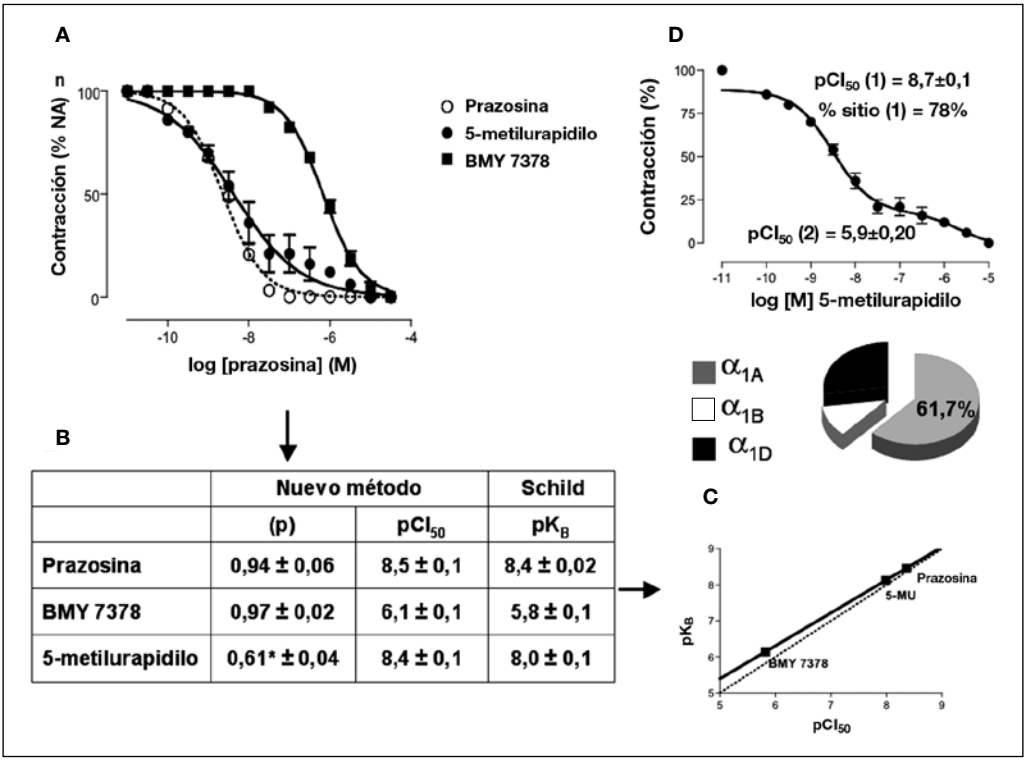
El aislamiento de los tejidos y su montaje se realizaron según el protocolo descrito en la bibliografía,[9-11] y el desarrollo experimental se detalla en la Fig. 2. La activación de los AR α_1 con una concentración de noradrenalina capaz de inducir la respuesta máxima (10^{-6}-10^{-5} M según los territorios) da lugar a una respuesta contráctil sostenida durante periodos de tiempo prolongados (Fig. 2A), mientras que la activación de los AR β se pone de manifiesto por la relajación observada tras la adición de los agonistas (isoprenalina 10^{-6} M o SR 58611A 10^{-6} M) sobre el tono contráctil previo y estable obtenido con solución despolarizante (Fig. 2B). Para calcular la potencia de los antagonistas según este nuevo método, se añaden concentraciones acumulativas crecientes de cada compuesto tras la máxima contracción (en el caso de los AR α_1, Fig. 2A) o relajación (en el caso de los AR β, Fig. 2B) obtenidas con el agonista adrenérgico correspondiente. Es importante determinar adecuadamente el intervalo de concentraciones a utilizar, de manera que incluya desde concentraciones que no revierten la actividad del agonista hasta las que dan lugar a la inhibición completa de su acción. La adición de concentraciones crecientes de los antagonistas α_1 da lugar a una relajación dependiente de la concentración (Fig. 2A), mientras que la adición de los antagonistas β da lugar a incrementos en el tono contráctil proporcionales a la concentración añadida, llegando a revertir totalmente la relajación inducida por el agonista β-adrenérgico. Las CCR de relajación o de recuperación del tono contráctil obtenidas con los antagonistas se ajustan a una sigmoidea (GraphPad Software, San Diego, CA) y se calcula el valor de la pCI_{50}. Este parámetro, que se ha utilizado como indicativo de la potencia de los distintos antagonistas, se correlaciona con los valores de pA_2 o pK_B determinados para los diferentes antagonistas según el método clásico de Schild. Otro parámetro que se obtiene a partir de las CCR de los antagonistas es la pendiente de la curva (p), y si ésta es significativamen-

te menor que la unidad se ha determinado la significación estadística del ajuste de la curva a uno o a dos sitios de unión (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados y discusión

Validación del método propuesto

Los antagonistas selectivos α_1, prazosina, BMY 7378 (α_{1D}-selectivo) y 5-metilurapidilo (α_{1A}-selectivo), relajan de forma dependiente de la concentración la contracción máxima inducida por noradrenalina en la arteria caudal (Fig. 3A), obteniéndose unos valores de pCI_{50} (Fig. 3B) que coinciden con los valores de pK_B determinados para estos mismos antagonistas según el método de Schild (Fig. 3C) y con los valores de pA_2 determinados por otros autores.[10] Resultados semejantes se obtienen en la aorta.[10] La pendiente de las CCR nos aporta información adicional. Observamos que es próxima a la unidad en las CCR de la prazosina y el BMY 7378, pero significativamente menor

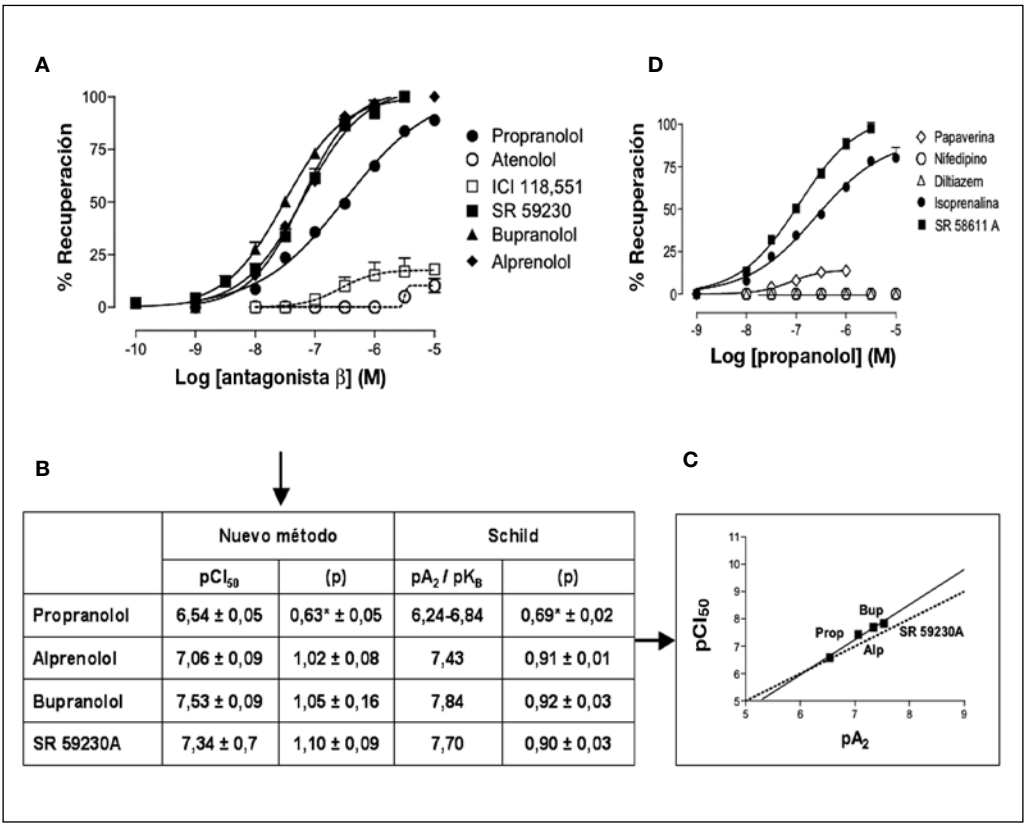


	Nuevo método		Schild
	(p)	pCI_{50}	pK_B
Prazosina	0,94 ± 0,06	8,5 ± 0,1	8,4 ± 0,02
BMY 7378	0,97 ± 0,02	6,1 ± 0,1	5,8 ± 0,1
5-metilurapidilo	0,61* ± 0,04	8,4 ± 0,1	8,0 ± 0,1

*Figura 3. Resultados obtenidos con los antagonistas selectivos de los adrenoceptores α_1 en arteria caudal de rata. (A) CCR de relajación de los distintos antagonistas sobre la meseta de contracción inducida por noradrenalina 10^{-5}M. (B) Parámetros característicos de los distintos antagonistas calculados según el nuevo método (pendiente y pCI_{50}) y el método de Schild (pK_B). *p <0.05 respecto a la unidad. (C) Representación de la correlación entre los valores de pCI_{50} y pK_B obtenidos por uno y otro método para cada antagonista. La línea discontinua representa la recta de identidad. (D) Representación gráfica del ajuste a dos lugares de unión de la CCR de relajación del 5-metilurapidilo, antagonista selectivo de los adrenoceptores α_{1A}. En este caso se obtienen dos valores de potencia distintos que corresponden a dos sitios por los que el antagonista tiene alta (pCI_{50} 1) y baja (pCI_{50} 2) afinidad. El porcentaje del sitio 1 se asemeja al grado de expresión de RNAm del receptor α_{1A} en ese tejido (diagrama de sectores). Resultados modificados de Gisbert et al.[10] y Marti et al.[11]*

para el 5-metilurapidilo. Ajustando esta CCR al modelo de dos sitios de unión (Fig. 3D), encontramos que las pCI_{50} obtenidas para cada sitio coinciden con los datos bibliográficos de afinidad del 5-metilurapidilo por el subtipo α_{1A} (sitio 1 de alta afinidad) y los subtipos α_{1B} y α_{1D} (sitio 2 de baja afinidad), correlacionándose el porcentaje del sitio 1 con los valores de RNAm descritos en este territorio (Fig. 3D).[11]

En el caso de los AR β, los antagonistas selectivos propranolol, alprenolol, bupranolol y SR 59230A (β_3 selectivo) revierten el efecto relajante máximo tanto de la isoprenalina (Fig. 4A) como de SR 58611A (agonista selectivo β_3, resultados no mostrados), obteniéndose unas CCR de recuperación del tono contráctil y unos valores de pendiente y pCI_{50} similares a los de pA_2/pK_B hallados con



	Nuevo método		Schild	
	pCI_{50}	(p)	pA_2 / pK_B	(p)
Propranolol	6,54 ± 0,05	0,63* ± 0,05	6,24-6,84	0,69* ± 0,02
Alprenolol	7,06 ± 0,09	1,02 ± 0,08	7,43	0,91 ± 0,01
Bupranolol	7,53 ± 0,09	1,05 ± 0,16	7,84	0,92 ± 0,03
SR 59230A	7,34 ± 0,7	1,10 ± 0,09	7,70	0,90 ± 0,03

*Figura 4. Resultados obtenidos con los antagonistas selectivos de los adrenoceptores β en colon de rata. (A) CCR de recuperación del tono contráctil de los distintos antagonistas sobre la relajación máxima inducida por isoprenalina 10^{-6}M. Tal como se observa en la gráfica, el atenolol (antagonista selectivo β_1) y el ICI 118,551 (antagonista selectivo β_2), no son capaces de revertir la relajación inducida por el agonista. (B) Parámetros característicos de los distintos antagonistas calculados según el nuevo método (pendiente y pCI_{50}) y el método de Schild (pendiente y pA_2/pK_B). *p <0.05 respecto a la unidad. (C) Representación de la correlación entre los valores de pCI_{50} y pA_2/pK_B obtenidos por uno y otro método para cada antagonista. La línea discontinua representa la recta de identidad. (D) Representación gráfica de la CCR de recuperación del tono contráctil de propranolol frente a diferentes relajantes de la musculatura lisa. Nótese que el propranolol recupera el tono contráctil tras la relajación inducida por los agonistas β (isoprenalina y SR 58611A), pero no es capaz de recuperar el tono contráctil tras la relajación inducida por papaverina, nifedipino y diltiazem.*

el método de Schild (Fig. 4B y C). Por el contrario, el atenolol (antagonista selectivo β_1) y el ICI 118.551 (antagonista selectivo β_2) no pudieron revertir los efectos relajantes de los agonistas en el colon (Fig. 4A), lo que indica que los receptores implicados en la respuesta relajante mediada por los AR β en este tejido son mayoritariamente del tipo β_3. Idénticos resultados se obtuvieron en íleon de rata (no mostrados).

Para descartar la posibilidad de que la recuperación del tono contráctil inducida por los antagonistas β se debiera a una acción inespecífica de éstos, se analizó también su capacidad para revertir la relajación máxima obtenida con otros compuestos que actúan por un mecanismo independiente de la estimulación de los AR β: papaverina (relajante inespecífico), nifedipino y diltiazem (bloqueantes de los canales de calcio), pero en ningún caso se observó recuperación del tono contráctil (Fig. 4D).

Se puede observar en la Fig. 4A y B que la CCR del propranolol presenta una pendiente menor que la unidad, pero su ajuste no es significativo para el modelo de dos sitios de unión. Resultados similares se encontraron en íleon de rata (no mostrados). Esto concuerda con la falta de recuperación del tono contráctil observada con los antagonistas selectivos β_1 y β_2, por lo que, en colon e íleon de rata, suponemos que existe una población mayoritaria de adrenoceptores β_3. Sobre ellos, el propranolol ejerce un antagonismo que no sigue el modelo del antagonismo competitivo según el método de Schild, y lo mismo observamos con nuestro método. La explicación a estos resultados puede encontrarse en la existencia de dos conformaciones distintas del receptor β_3, con distinto grado de acoplamiento a los sistemas de señalización implicados en la transducción de la señal, lo que explicaría la pendiente de las curvas menor que la unidad, y confirmaría, en receptores nativos, la existencia de las dos conformaciones observadas en AR β_3 clonados y expresados en distintas líneas celulares.[12]

Por tanto, podemos concluir que los resultados obtenidos validan la utilización del nuevo método para analizar la interacción fármaco-receptor mediante estudios funcionales en territorios nativos, siendo un protocolo especialmente útil respecto a los tradicionales porque supone un considerable ahorro en tiempo y en número de experimentos y de animales. Esta última cuestión adquiere una especial relevancia si consideramos los aspectos éticos implicados en cualquier trabajo de experimentación animal o cuando se trabaja con muestras difíciles de obtener, como es el caso de los tejidos humanos.

Utilidad del nuevo método

Caracterización funcional de la población de adrenoceptores α_1 y β en un determinado territorio

Utilizando antagonistas selectivos hemos caracterizado los subtipos de AR α_1 funcionalmente predominantes en la arteria caudal (α_{1A}), la aorta (α_{1D}), la arteria iliaca (α_{1D}/α_{1A}), la mesentérica (α_{1A}/α_{1D}) y las arterias mesentéricas de pequeño calibre (α_{1A}), y hemos observado un diferente predominio funcional de los subtipos de AR α_1 a lo largo del árbol vascular.[13] Es interesante señalar que este método nos ha permitido demostrar la presencia de una población mixta de AR α_{1D} y α_{1A} en algunas arterias, como la iliaca y la mesentérica, al obtener CCR de relajación de los antagonistas selectivos BMY 7378 y 5-metilurapidilo con pendientes menores que la unidad y que se ajustan significativamente mejor al modelo de dos lugares de unión. Además, la presencia funcional mayoritaria de estos subtipos se correlacionó con la expresión de RNAm determinada en los diferentes vasos estudiados.[11]

Cambios en la funcionalidad de los receptores asociados a una determinada enfermedad

Aplicando el método propuesto hemos hallado cambios en la funcionalidad de los subtipos de AR α_1 en la hipertensión. El objetivo que nos planteamos fue la determinación de cambios funcionales del subtipo α_{1D} en dife-

rentes vasos (aorta, arteria mesentérica, caudal, iliaca, arterias mesentéricas de primera y segunda rama) procedentes de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles normotensos (WKY), y determinar si estos cambios se producían en los animales adultos ya hipertensos o tenían lugar en el estado prehipertensivo. Además, se analizó si el tratamiento con un agente antihipertensivo como el captopril podía revertir los cambios en la expresión funcional del subtipo α_{1D}. La utilización del método de Schild para determinar las potencias de dos antagonistas (prazosina y BMY 7378) en seis vasos distintos procedentes de seis grupos diferentes de animales supondría la realización de un gran número de experimentos y la utilización de muchos animales. El nuevo método nos permitió optimizar el número de experimentos y de animales, y observamos un aumento en la funcionalidad del subtipo α_{1D} en animales SHR adultos, pero no en jóvenes, aumento que no se produce si los animales son pretratados con captopril, lo que sugiere una posible implicación del subtipo α_{1D} en la génesis y el mantenimiento de la hipertensión arterial.[9]

Caracterización de nuevos compuestos como agonistas/antagonistas de los adrenoceptores α_1 y β_3

El método propuesto permite determinar de forma rápida y sencilla la actividad y la potencia como agonistas/antagonistas de una serie de compuestos, así como su selectividad para cada subtipo de AR. Gracias a él hemos determinado la potencia antagonista y la selectividad sobre los distintos subtipos de AR α_1 de una serie de 79 alcaloides bencilisoquinoleínicos y aporfínicos, y de los resultados obtenidos destacamos la acción de la glaucina, la boldina y sus derivados halogenados como antagonistas α_{1A} selectivos, así como la ausencia de afinidad de la aminoboldina por el subtipo α_{1D}.[14] En el caso de los AR β_3 hemos ensayado la actividad de siete alcaloides bencilisoquinoleínicos, destacando la actividad de la tetrahidropapaverolina y la higenamina como agonistas β_3.[15]

BIBLIOGRAFÍA

1. Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. Br J Pharmacol. 1959;14:48-58.
2. Kenny BA, Chalmers DH, Philpott PC, Naylor AM. Characterization of an α_{1D}-adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. Br J Pharmacol. 1995;115:981-6.
3. Hussain MB, Marshall I. Characterization of α_1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. Br J Pharmacol. 1997;122:849-58.
4. Lachnit WG, Tran AM, Clarke DE, Ford AP. Pharmacological characterization of an α_{1A}-adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. Br J Pharmacol. 1997;120: 819-26.
5. McLaughlin DP, MacDonald A. Evidence for the existence of 'atypical' β-adrenoceptors (β_3-adrenoceptors) mediating relaxation in the rat distal colon in vitro. Br J Pharmacol. 1990;101:569-74.
6. Kaumann AJ, Molenaar P. Differences between the third cardiac β-adrenoceptor and the colonic β_3-adrenoceptor in the rat. Br J Pharmacol. 1996;118:2085-98.
7. Manara L, Badone D, Baroni M, Boccardi G, Cecchi R, Croci T, et al. Functional identification of rat atypical β-adrenoceptors by the first β_3-selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins. Br J Pharmacol. 1996;117:435-42.
8. Roberts SJ, Papaioannou M, Evans BA, Summers RJ. Characterization of β-adrenoceptor mediated smooth muscle relaxation and detection of mRNA for β_1-, β_2- and β_3-adrenoceptors in rat ileum. Br J Pharmacol. 1999;127:949-61.
9. Gisbert R, Ziani K, Miquel R, Noguera MA, Ivorra MD, Anselmi E, et al. Pathological role of a constitutively active population of α_{1D} adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. Br J Pharmacol. 2002;135:206-16.
10. Gisbert R, Madrero Y, Sabino V, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocón P. Functional characterization of α_1-adrenoceptor subtypes in vascular tissues using different experimental approaches: a comparative study. Br J Pharmacol. 2003;138:359-68.

11. Martí D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, et al. Correlation between mRNA levels and functional role of α_1-adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of α_{1L} as a functional isoform of the α_{1A}-adrenoceptor. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;289: H1923-32.
12. Baker JG. Evidence for a secondary state of the human β_3-adrenoceptor. Mol Pharmacol. 2005;68:1645-55.
13. Ziani K, Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocón P. Modulatory role of a constitutively active population of α_{1D}-adrenoceptors in conductance vessels. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;282:H 475-81.
14. Ivorra MD, Valiente M, Martínez S, Madrero Y, Noguera MA, Cassels BK, et al. 8-NH_2-boldine, an antagonist of α_{1A} and α_{1B} adrenoceptors without affinity for α_{1D} subtype: structural requirements for aporphines at α_1-adrenoceptor subtypes. Planta Med. 2005;71:897-903.
15. Tur R, Ivorra MD, Anselmi E, Miquel R, D'Ocón P. Selective affinity of some benzylisoquinolines for β_3-adrenoceptors. Met Find Exp Clin Pharmacol. 2002;24(Suppl. A):162.

DISCUSIÓN

J. Sallés: En vez de utilizar concentraciones máximas, ¿habéis probado concentraciones menores? En ese caso, ¿se alejan los valores de pA_2 y de pCI_{50}?

M.D. Ivorra: Cuando utilizas concentraciones menores del agonista de los adrenoceptores α, la contracción no se mantiene estable a lo largo del tiempo y por lo tanto nos invalida la aplicación del método. Hemos ensayado con concentraciones aún mayores que las maximales y hemos comprobado que, efectivamente, la pCI_{50} se desplaza y se aleja del valor de pA_2. Este desplazamiento mantiene cierta proporcionalidad con la concentración que utilizas.

J. Sallés: ¿Y si se aplica la ecuación de Cheng-Prusoff?

M.D. Ivorra: Con esta ecuación, los valores se distorsionan totalmente.

J. Sallés: Entiendo que el método es bueno para antagonistas de alta afinidad, pero que podría haber problemas para los de baja afinidad. Probablemente se necesitarían tiempos de incubación más largos para llegar a condiciones de equilibrio y obtener valores correctos de pA_2. El Dr. Badia publicó un método muy parecido al vuestro, referente a la inhibición de la respuesta contráctil inducida por un estímulo eléctrico en el conducto deferente por agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos, y obtenía resultados similares.

P. D'Ocón: El método ha demostrado ser válido para los antagonistas de alta y baja afinidad probados en aorta y en caudal a los mismos tiempos, ya que en todos los casos el valor de potencia obtenido se corresponde exactamente con la afinidad.

J.M. Baeyens: Los datos presentados son de antagonistas competitivos. ¿Qué resultados crees que se podrían obtener utilizando antagonistas no competitivos?

M.D. Ivorra: En ese caso, la reversión de la respuesta puede que no sea directamente proporcional a la concentración de antagonista utilizada, obteniéndose interacciones más complejas. Hemos visto que estas interacciones complejas se pueden demostrar con este nuevo método, por la pendiente de las curvas concentración-respuesta del antagonista. En el caso del propranolol, por ejemplo, se obtiene una pendiente menor que la unidad, al igual que la que se obtiene por el método de Schild. Y esto no obedece a la presencia de varios subtipos porque en el colon existe una población mayoritaria de adrenoceptores β_3. Puede deberse a la presencia de distintos estados conformacionales del receptor β_3, descritos en receptores clonados. Por tanto, este método también

puede explicar y demostrar este tipo de interacciones complejas.

J. Giraldo: Creo que valdría la pena desarrollar modelos matemáticos mecanísticos que intenten dar cuenta de las posibles interacciones moleculares complejas que tienen lugar, más que aplicar un modelo empírico y describir simplemente la forma de la curva.

F. Pérez-Vizcaíno: Parece que definir la concentración máxima a utilizar es clave en este método, y muy complicado porque la curva es una asíntota.

M.D. Ivorra: Sí, se elige la concentración de agonista que da lugar al primer punto de la asíntota, y de hecho hemos utilizado concentraciones diferentes según el territorio, 10^{-6} M de noradrenalina en aorta y 10^{-5} M en caudal, y en estas condiciones los valores de pCI_{50} obtenidos para los distintos antagonistas coinciden con los valores de pA_2.

J. Burgueño: En relación a las concentraciones, parece ser que se elige la menor de las concentraciones máximas.

M.D. Ivorra: Sí, eliges la primera concentración que te ha dado la asíntota, que posiblemente corresponde al 90% a 95% de la respuesta máxima. No se utilizan concentraciones más altas.

E. Vila: Tengo la impresión de que en la arteria mesentérica sin endotelio es difícil mantener el tono contráctil a pesar de trabajar con concentraciones máximas. Sin saber muy bien por qué, hay días que funciona y otros que no. Por eso creo que en los vasos sanguíneos probablemente sea más cómodo y más rápido hacer curvas concentración-respuesta con el agonista en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de antagonista.

J. Llenas: En su presentación nos ha mostrado que con los receptores α adrenérgicos existe una buena correlación entre los datos de fijación y los funcionales, pero quiero aprovechar para comentar que no siempre es así, y un buen ejemplo de ello son los agonistas β_2 adrenérgicos como el salbutamol. En este caso, el estudio funcional es todavía insustituible cuando se trata de identificar nuevos productos.

M.D. Ivorra: Estoy totalmente de acuerdo. Es verdad que con los receptores β_2 precisamente no se observa correlación.

F. Bosch: ¿Utilizáis los agonistas β_3 como herramienta farmacológica o con finalidad terapéutica?

M.D. Ivorra: El objetivo era buscar compuestos con actividad selectiva sobre los adrenoceptores β_3 con la finalidad de utilizarlos como herramienta farmacológica, pero también por su posible aplicación terapéutica. Analizamos diferentes alcaloides bencilisoquinoleínicos que, por su semejanza con el trimetoquinol, podían tener esa actividad.

F. Bosch: ¿Cuál sería su posible aplicación terapéutica?

M.D. Ivorra: Intestinal.

A.G. Fernández: Querría ampliar un poco la información acerca de la aplicabilidad de los agonistas β_3, tanto en el campo intestinal como en otros. Hace años, aunque sin éxito, se intentaron desarrollar productos para tratar la úlcera gástrica y duodenal; en el ámbito de la obesidad, algunos fármacos están avanzando en clínica; y para la incontinencia urinaria por vejiga hiperactiva hay un agonista selectivo β_3 que ya ha superado la fase 2a clínica.

A. Badia: ¿Habéis hecho algún experimento poniendo el agonista durante todo el tiempo que está también el antagonista para ver si hay un proceso de desensibilización del receptor?

M.D. Ivorra: Sí, en el caso de los adrenoceptores α la contracción se mantenía con el tiempo.

A. Badia: En el caso de los adrenoceptores β parece ser que hay un proceso de desensibilización más importante, que luego podría falsificar resultados. Creo que es una cuestión importante a tener en cuenta.

M.D. Ivorra: Sí, pero estás añadiendo concentraciones del antagonista que ya están revirtiendo la unión del agonista con ese receptor.

P. D'Ocón: Además, en este caso concreto, no se observaba un fenómeno de desensibilización muy marcado cuando se hacían las curvas dosis-respuesta en repetidas ocasiones. Quizá sea una característica de los β_3 que los diferencia de los otros subtipos.

Actividad vasodilatadora del *trans*-resveratrol en la aorta torácica aislada de rata: una clara evidencia de sus efectos cardioprotectores

F. Orallo
Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

Resumen: *Con el objeto de intentar dilucidar si el* trans-*resveratrol o* (E)-*resveratrol (3,4',5-trihidroxi*-trans-*estilbeno;* t-*RESV) puede estar implicado en los efectos protectores del consumo prolongado y diario de cantidades moderadas de vino frente a la incidencia de diversas enfermedades cardiovasculares, hemos estudiado por primera vez el mecanismo de la potencial actividad vasodilatadora de este compuesto polifenólico en la aorta de rata. El* t-*RESV (1-10 µM) no tuvo efecto sobre las contracciones inducidas por la (-)-noradrenalina (NA, 1 µM) y por altas concentraciones de KCl extracelular (60 mM) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Sin embargo, de una forma dependiente de la concentración, relajó la respuesta contráctil producida por ambos agentes vasoconstrictores en anillos intactos de aorta de rata. Los efectos vasodilatadores del* t-*RESV fueron completamente inhibidos por la* N^G*-nitro-L-arginina (L-NOARG, 0,1 mM) y por el azul de metileno (AM, 10 µM), pero no se vieron afectados por la atropina (10 µM) ni por la yohimbina (1 µM). El efecto inhibitorio producido por la L-NOARG fue antagonizado por la L-arginina (0,1 mM), pero no por la D-arginina. El* t-*RESV (1-10 µM) no modificó la actividad enzimática de la sintetasa constitutiva del óxido nítrico (NOSce) en homogeneizados de aorta de rata. Además, tampoco mostró propiedades* scavenger *(barredoras, secuestradoras, atrapadoras o quelantes) de radicales superóxido* ($O_2^{\bullet -}$) *ni inhibidoras de la xantina oxidasa (XO). Sin embargo, el* t-*RESV (1-10 µM) disminuyó notablemente la actividad enzimática de la oxidasa del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH)/fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH) en homogenizados de aorta de rata [NADH/NADPH o NAD(P)H oxidasa vascular]. Todos los resultados anteriores sugieren que: 1) el efecto vasorrelajante característico dependiente del endotelio del* t-*RESV en la aorta de la rata parece deberse a un incremento de la actividad de la vía de la L-arginina-óxido nítrico* ($NO^{\bullet}$)*-monofosfato cíclico de 3'-5'-guanosina (GMP cíclico,* GMP_c*), posiblemente mediante la inhibición de la actividad de la NADH/NADPH oxidasa vascular, con la subsiguiente disminución de la biosíntesis celular basal de* $O_2^{\bullet -}$ *y, por consiguiente, de la inactivación del* $NO^{\bullet}$ *por dichos radicales; 2) este compuesto polifenólico natural podría desempeñar un papel importante en los efectos cardioprotectores producidos a largo plazo por el consumo diario de cantidades moderadas de vino.*

Palabras clave: *Trans*-resveratrol – Aorta de rata – Vasodilatación – Sintetasa constitutiva del óxido nítrico – Sistema hipoxantina-xantina oxidasa – NAD(P)H oxidasa.

Introducción

Recientemente, los estudios sobre el consumo de vino han recibido una considerable atención, tanto por parte de la comunidad científica como del público en general. La baja incidencia de cardiopatía isquémica y otras enfermedades cardiovasculares en la población del sur de Francia, a pesar de tener una dieta rica en grasas saturadas y unos factores de riesgo similares a los de otros países industrializados (escaso ejercicio, elevado consumo de tabaco, etc.), se ha atribuido al mayor consumo continuado y moderado de vino (especialmente tinto), fenómeno que se denomina "la paradoja francesa".[1,2] Como los efectos beneficiosos y protectores del vino son independientes de su contenido en alcohol, en estos últimos años se han realizado intensas investigaciones para identificar los principios activos responsables. Aunque tales principios todavía no se conocen, posiblemente por la compleja mezcla de sustancias presentes en el vino con efectos opuestos sobre el sistema cardiovascular, existen varias moléculas candidatas, entre las que se encuentra el *trans*-resveratrol o *(E)*-resveratrol (3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno; *t*-RESV) y otros compuestos de naturaleza polifenólica.[3-7]

Hemos estudiado por primera vez la posible actividad vasodilatadora del *t*-RESV en la aorta de rata mediante estudios funcionales, y los mecanismos por los que dicha actividad se produce, con el objeto de intentar dilucidar si este polifenol de origen natural puede estar implicado en los efectos protectores del consumo moderado y prolongado de vino frente a la incidencia de diversas patologías cardiovasculares, e intentar explicar el fenómeno de la paradoja francesa.

Efectos vasodilatadores del *t*-RESV en la aorta torácica aislada de rata

Experimentos iniciales

La primera serie de experimentos fueron diseñados para estudiar los efectos del *t*-RESV sobre las contracciones inducidas por la (-)-noradrenalina (NA) y el KCl, dos agentes vasoconstrictores que actúan por mecanismos diferentes.

El *t*-RESV (1-10 μM) no tuvo efecto sobre las contracciones inducidas por la NA (1 μM) y por altas concentraciones de KCl extracelular (60 mM) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Sin embargo, de una forma dependiente de la concentración, relajó la respuesta contráctil producida por ambos agentes vasoconstrictores en anillos intactos de aorta de rata. Los correspondientes valores (media ± error estándar de cinco experimentos) de las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) presentaron diferencias significativas ($p < 0.01$) (Fig. 1). Los efectos vasorrelajantes tan característicos, dependientes del endotelio, del *t*-RESV sobre las contracciones inducidas por elevadas concentraciones de KCl extracelular fueron significativamente menores que los obtenidos frente a las contracciones inducidas por NA, ya que los porcentajes máximos de relajación ($R_{máx}$) fueron menores y la CI_{50} mayor (Fig. 1).[8,9]

Debido a que el óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) tiene efectos vasodilatadores similares a los del *t*-RESV,[10] con estos experimentos iniciales y preliminares empezamos a sospechar que el *t*-RESV podría actuar potenciando de alguna forma los efectos del $NO^{\bullet}$; esto es, podría producir un incremento de la actividad de la vía de la L-arginina-$NO^{\bullet}$-monofosfato cíclico de 3',5'-guanosina (GMP_c).

La ruta de la L-arginina-$NO^{\bullet}$-GMP_c

En tejidos vasculares, la ruta de la L-arginina-$NO^{\bullet}$-GMP_c se inicia en las células endoteliales, las cuales, en condiciones fisiológicas, sintetizan bajas concentraciones de $NO^{\bullet}$ (en el rango pico-nanomolar) a partir de un aminoácido, la L-arginina, por acción de una enzima que es una de las isoformas de la sintetasa del $NO^{\bullet}$ (NOS), denominada sintetasa constitutiva endotelial del $NO^{\bullet}$ dependiente de Ca^{2+}-calmodulina (NOSE, NOS III, NOS-3 o NOSce), normalmente de localización citoplasmática.[11]

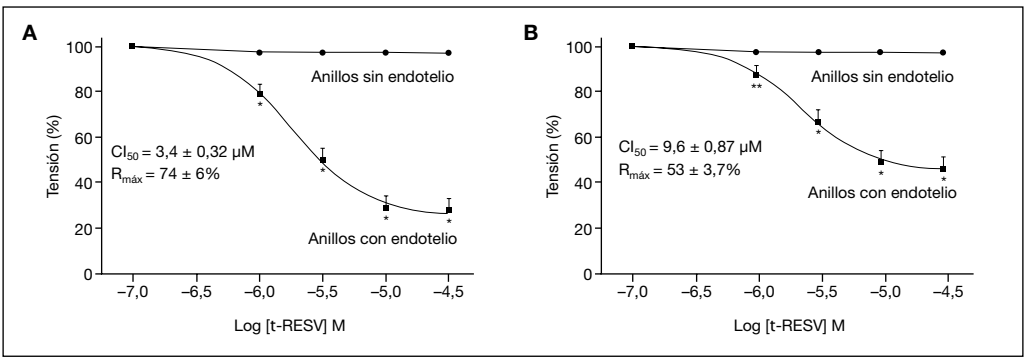


Figura 1. Curvas concentración-respuesta de la vasorrelajación inducida por el t*-RESV (1-30 μM) en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con NA (1 μM; panel A) o con altas concentraciones de KCl extracelular (60 mM; panel B). Cada punto representa la media ± error estándar (indicado por barras verticales) de cinco experimentos. Grado de significación estadística: **p <0.05 o *p <0.01 con respecto a la tensión máxima (100%).* $R_{máx}$ *= porcentaje máximo de relajación.*

Una vez producido y liberado por el endotelio, el NO• difunde a las células musculares lisas de la túnica media del vaso, en las cuales va a estimular una enzima presente en el citoplasma de esas células, la guanilil ciclasa soluble, que transforma el GTP, procedente del metabolismo celular, en un segundo mensajero, el GMP_c, que por una serie de mecanismos no demasiado bien conocidos va a actuar sobre las células lisas vasculares haciendo que se relajen, es decir, produciendo vasodilatación.[11,12]

El NO• producido en el endotelio puede combinarse, en condiciones fisiológicas, con una serie de radicales libres que son los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Los $O_2^{\bullet-}$ se producen tanto en la célula endotelial como en la célula lisa vascular, sobre todo por la acción de dos enzimas: la xantina oxidasa (XO), que utiliza como sustrato preferente la xantina, y la oxidasa del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH)/fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH) [NADH/NADPH o NAD(P)H oxidasa], que utiliza, sobre todo, como sustrato preferente en la célula lisa vascular el NADH (ver más adelante). El NO•, al combinarse con esos $O_2^{\bullet-}$, se transforma en peroxinitrito ($ONOO^-$), que ya no tiene los efectos cardiovasculares beneficiosos del NO• (Fig. 2).[11]

La vía de la L-arginina-NO•-GMP_c puede ser modulada por diversas herramientas farmacológicas que actúan a diferentes niveles, como la N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG), un inhibidor de todas las isoformas de la NOS y, por consiguiente, de la biosíntesis del NO•, o por el azul de metileno (AM) y el ODQ (dos conocidos inhibidores de la guanilil ciclasa soluble).[12] Precisamente son estos fármacos (herramientas farmacológicas) los que bloquean los efectos vasodilatadores del *t*-RESV. En efecto, la adición acumulativa de *t*-RESV (1-10 μM) no relajó las contracciones inducidas por L-NOARG + NA, L-NOARG + KCl, AM + NA, AM + KCl, ODQ + NA y ODQ + KCl (n = 5, p >0.05) en anillos intactos de aorta de rata.[9]

Por otro lado, el inhibidor de la síntesis de NO•, la L-NOARG (0,1 mM), invirtió la relajación inducida por el *t*-RESV, es decir, hizo que el tejido vascular se contrajera hasta un tono próximo al que presentaba antes de la adición del *t*-RESV. Además, el incremento en el tono inducido por la L-NOARG fue revertido, a su vez, por la L-arginina (0,1 mM), el sustrato fisiológico de la NOS, pero no por la D-arginina (0,1 mM), lo que indica la naturaleza competitiva y enantioselectiva de la interacción (Fig. 3).

Con todos estos resultados, cada vez era más evidente que los efectos vasorrelajantes

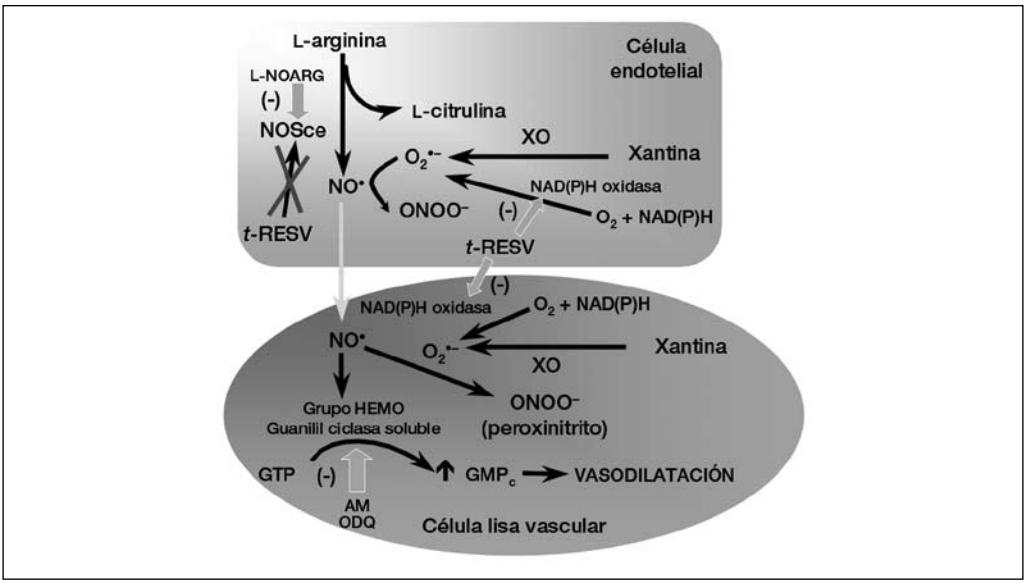


Figura 2. Representación esquemática de la ruta de la L*-arginina-NO•-GMP$_c$. Se indican los lugares en que pueden interferir el* t*-RESV, la* L*-NOARG, el AM y el ODQ (para más detalles ver el texto).*

característicos dependientes del endotelio del *t*-RESV podían ser mediados por un incremento de la vía de la L-arginina-NO•-GMP$_c$, básicamente por dos mecanismos: a) incremento de la síntesis/liberación del NO• por las células endoteliales y b) disminución de la biotransformación (inactivación) del NO•.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se diseñaron una serie de experimentos en la aorta de rata destinados a evaluar:

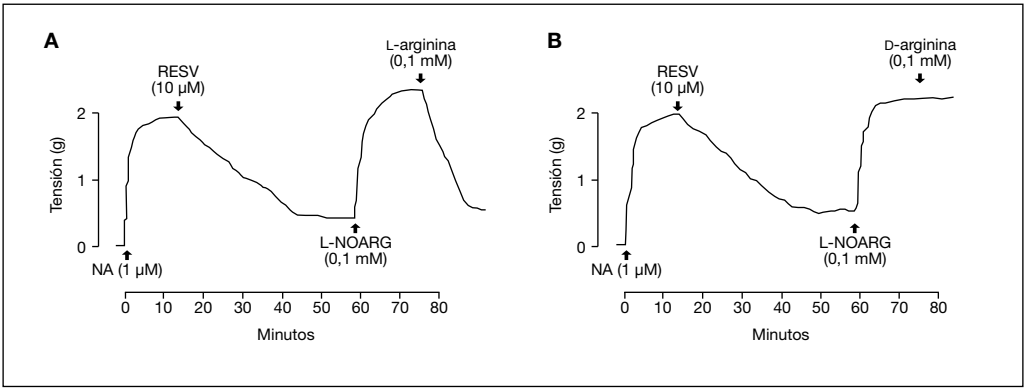


Figura 3. Registro representativo que muestra los efectos vasorrelajantes del t*-RESV (10 μM) en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con NA (1 μM). La vasorrelajación producida por el* t*-RESV fue revertida por el inhibidor de la NOSce, la* L*-NOARG (0,1 mM). Esta contracción inducida por la* L*-NOARG fue invertida, a su vez, por el sustrato fisiológico de la NOS, la* L*-arginina (0,1 mM; panel A), pero no por la* D*-arginina (0,1 mM; panel B). Las flechas indican el momento de la adición de los fármacos correspondientes.*

1) El posible incremento de la biosíntesis de $NO^{\bullet}$, viendo sobre todo la posible activación directa o indirecta de la NOSce.
2) La posible inhibición por parte del *t*-RESV de la biotransformación del $NO^{\bullet}$ en el organismo. De esta forma intentamos estudiar los posibles efectos antioxidantes del *t*-RESV, esto es, como *scavenger* (barredor, secuestrador, atrapador o quelante) de los $O_2^{\bullet -}$ o bien como inhibidor de la biosíntesis de $O_2^{\bullet -}$, bien por inhibición directa de la actividad enzimática de la XO, o de la otra enzima que es capaz de sintetizarlo en el organismo en condiciones fisiológicas, la NAD(P)H oxidasa.

¿Incrementa el t-RESV la síntesis/liberación de $NO^{\bullet}$ por las células endoteliales?

Estudiamos, en primer lugar, los posibles efectos directos del *t*-RESV sobre la actividad enzimática de la NOSce, midiendo la conversión de L-[^{3}H]arginina en L-[^{3}H]citrulina y utilizando homogenizados de aorta de rata como fuente de enzima.

Con los experimentos correspondientes nos llevamos la primera decepción, porque el *t*-RESV (1-10 μM) no modificó la actividad de la NOSce (Fig. 2), lo que sugiere que los efectos vasodilatadores del *t*-RESV no se deben a una activación directa de la NOS y, por consiguiente, a un incremento de la biosíntesis de $NO^{\bullet}$.[9]

La posibilidad de una estimulación indirecta de la NOSce por el *t*-RESV fue evaluada con otros experimentos diferentes.

En diversas ocasiones se ha demostrado que, en la aorta de la rata, la activación de distintos subtipos de receptores muscarínicos por la acetilcolina o de receptores adrenérgicos α_2 endoteliales por agonistas selectivos (por ejemplo BHT-920), respectivamente, produce un aumento en la concentración de calcio libre citosólico ($[Ca^{2+}]_c$), que estimula la NOSce y la subsiguiente y rápida producción/liberación de $NO^{\bullet}$ (Fig. 4). Aunque el mecanismo todavía no está claro, este incremento de la $[Ca^{2+}]_c$

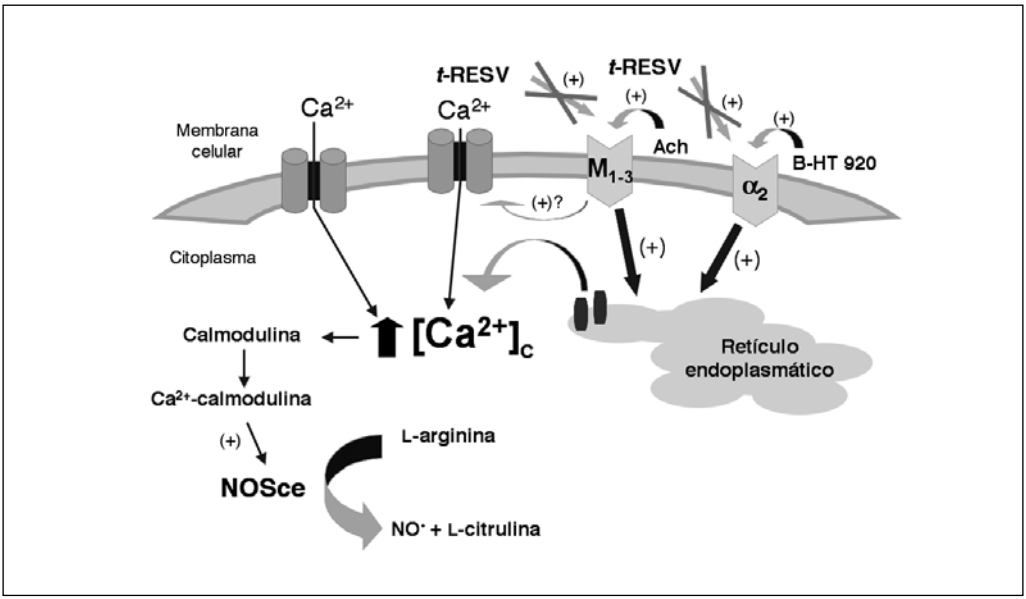


Figura 4. Esquema del mecanismo de la activación indirecta de la NOSce mediante la estimulación de receptores muscarínicos y receptores adrenérgicos α_2 en la célula endotelial. Como se describe en el texto y se indica en la figura, nuestros experimentos demuestran que el t-*RESV no es un agonista de esos receptores. Ach = acetilcolina.*

parece deberse fundamentalmente a la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares de almacenamiento (retículo endoplasmático), y posiblemente también a un aumento del flujo de entrada de Ca^{2+} a través de los hipotéticos y controvertidos canales transmembrana de Ca^{2+} operados por receptor.[13-15] Todos estos efectos son bloqueados específicamente por antagonistas selectivos de los receptores anteriores, como la atropina (un conocido antagonista no selectivo de los diferentes subtipos de receptores muscarínicos) y la yohimbina (un agente bloqueante selectivo de los receptores adrenérgicos α_2).[12]

Por ello, para averiguar si el *t*-RESV actúa como agonista de estos receptores y activa de forma indirecta la NOSce al desencadenar la cascada de eventos mencionados, estudiamos la influencia de estos antagonistas sobre los efectos vasodilatadores del *t*-RESV y nos llevamos nuestra segunda decepción, ya que las CI_{50} del *t*-RESV frente a las contracciones inducidas por NA y KCl fueron prácticamente similares en ausencia y en presencia de yohimbina y de atropina (Tabla I), lo que sugiere que el *t*-RESV no activa receptores muscarínicos/receptores adrenérgicos α_2 y, por consiguiente, no estimula de forma indirecta la NOSce en la aorta de rata (Fig. 4).

¿Disminuye el t-RESV la biotransformación (inactivación) del NO•?

En vista de estos resultados negativos investigamos (en una segunda serie de experimentos) el posible efecto del *t*-RESV sobre la biotransformación del $NO^{\bullet}$, para ver si podía atrapar los $O_2^{\bullet-}$ encargados de su biotransformación a $ONOO^-$, tanto en la célula endotelial como en la célula vascular, o bien si podía actuar sobre cualquiera de las enzimas encargadas de la biosíntesis de $O_2^{\bullet-}$, esto es, sobre la XO o sobre la NAD(P)H oxidasa.

La potencial actividad del *t*-RESV como *scavenger* selectivo de $O_2^{\bullet-}$ fue evaluada utilizando el denominado sistema hipoxantina (HX)-XO, el cual se puede utilizar al mismo tiempo para estudiar los posibles efectos del *t*-RESV sobre la XO comercial (procedente de leche de mantequilla). Se ha descrito que la HX, en presencia de oxígeno, por acción de la XO se transforma en xantina, $O_2^{\bullet-}$ y agua oxigenada (H_2O_2). Por otro lado, la xantina, que se genera en esa primera reacción, combinada con el oxígeno (por acción también de la XO) se transforma en ácido úrico, $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2. Los $O_2^{\bullet-}$ generados por este sistema reaccionan con el azul de nitrotetrazolio (NBT) (que es reducido en la reacción) para producir formazán. La formación de este compuesto coloreado (formazán) y, por lo tanto, la cantidad de $O_2^{\bullet-}$ generados enzimáticamente, pueden medirse por espectrofotometría a 560 nm. Paralelamente, la producción de ácido úrico por la XO puede medirse a 265 nm (Fig. 5). Cuando un fármaco disminuye la cantidad de $O_2^{\bullet-}$ (es decir, la reducción del NBT), y al mismo tiempo no afecta a la formación de ácido úrico, es considerado como un neutralizador selectivo de $O_2^{\bullet-}$. Por otro lado, si un fármaco inhibe la actividad de la XO, entonces es capaz de disminuir tanto la concentración de ácido úrico como la de $O_2^{\bullet-}$.[16]

En nuestros experimentos, a diferencia de la superóxido dismutasa [SOD, 0,1-10 U/ml; CI_{50} (media ± error estándar) = 1,02 ± 0,06 U/ml (n = 5)], un conocido *scavenger* selectivo de $O_2^{\bullet-}$, el *t*-RESV (1-10 μM), no modificó la producción de formazán por la reacción de los $O_2^{\bullet-}$ (generados por el sistema HX-XO) con el NBT (Fig. 5). Además, a diferencia del alopurinol [1-10 μM; CI_{50} (media ± error estándar) = 3,63 ± 0,29 μM (n = 5)], un inhibidor de

TABLA I. CI_{50} (μM) de la vasorrelajación inducida por el *t*-RESV en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con NA (1 μM) o con altas concentraciones de KCl extracelular (60 mM), en ausencia y en presencia de atropina (10 μM) y de yohimbina (1 μM). Cada valor representa la media ± error estándar de cinco experimentos.

Protocolos	(-)-NA	KCl
t-RESV	3,4 ± 0,32	9,6 ± 0,87
Atropina + *t*-RESV	3,2 ± 0,23	9,33 ± 0,76
Yohimbina + *t*-RESV	3,3 ± 0,26	8,97 ± 0,88

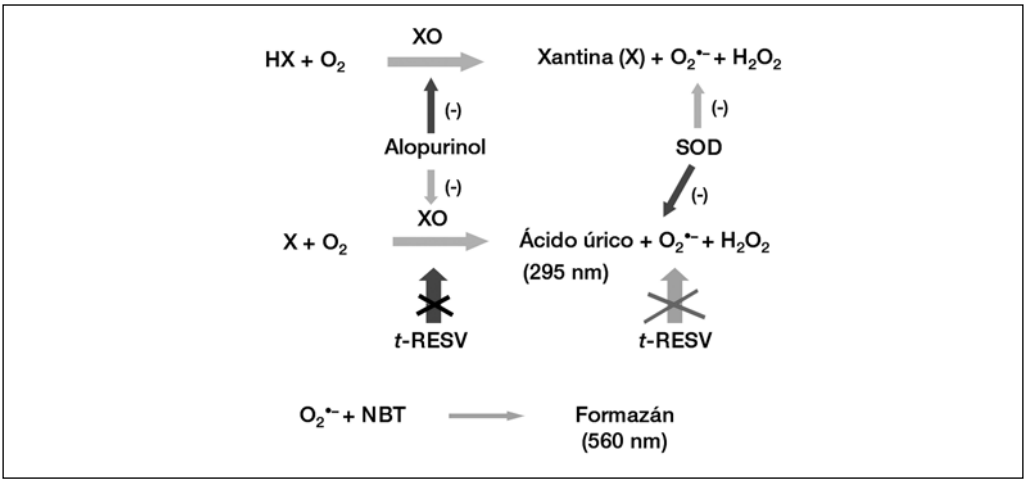


Figura 5. Representación esquemática de las reacciones producidas en el sistema HX-XO. Como se detalla en el texto y se indica en la figura, nuestros experimentos demuestran que el t-*RESV no es un* scavenger *selectivo de* $O_2^{\bullet-}$ *ni un inhibidor de la XO comercial.*

referencia de la XO, el *t*-RESV no tuvo efecto sobre la oxidación enzimática de la xantina a ácido úrico catalizada por la XO (Figs. 5 y 6). Estos resultados indican claramente que el *t*-RESV no muestra propiedades neutralizadoras selectivas de $O_2^{\bullet-}$ ni propiedades inhibidoras directas de la XO y, por lo tanto, que esas propiedades no están implicadas en los efectos vasorrelajantes dependientes del endotelio del *t*-RESV en la aorta de rata.[9] Era nuestra tercera decepción.

Con todos estos resultados negativos estábamos bastante deprimidos y desesperados, porque sólo nos quedaba una última posibilidad en la hipótesis de la que habíamos partido: que el *t*-RESV inhibiese la NAD(P)H oxidasa, la segunda enzima que participa en la biosíntesis de $O_2^{\bullet-}$.

La NAD(P)H oxidasa es una enzima de membrana (aunque tiene también algunas subunidades citosólicas) que, a partir del oxígeno y del NADH (sustrato preferente en células vasculares) o el NADPH (sustrato preferente en células fagocíticas) procedentes del metabolismo celular, cataliza la biosíntesis de NAD^+, $NADP^+$ y $O_2^{\bullet-}$ [estequiometría: $2O_2$ + NAD(P)H $\Rightarrow$ $2O_2^{\bullet-}$ + $NAD(P)^+$ + H^+] (Fig. 6). La NAD(P)H oxidasa vascular difiere de la NAD(P)H oxidasa fagocítica en varias subunidades.[16,17]

Iniciamos los experimentos correspondientes para estudiar los posibles efectos del *t*-RESV sobre la actividad de la NAD(P)H oxidasa utilizando homogenizados de aorta de rata como fuente enzimática (la verdad es que sin muchas esperanzas), y nos llevamos una gran alegría al ver que el *t*-RESV es un potente inhibidor de esta enzima y, por consiguiente, es un buen antioxidante ya que disminuye la biosíntesis de $O_2^{\bullet-}$. En efecto, el *t*-RESV (1-10 μM), al igual que el difenileniodonio (0,5-3 μM) [DPI, un inhibidor de referencia de la NAD(P)H oxidasa], disminuyó notablemente, de forma dependiente de la concentración, la actividad enzimática de la NADH/NADPH o NAD(P)H oxidasa en la aorta de rata (Figs. 2 y 6), es decir, la señal de quimioluminiscencia específica emitida por la reacción entre la lucigenina y los $O_2^{\bullet-}$ generados a partir del oxígeno y del NADH (el sustrato preferido por la NADH/NADPH oxidasa en tejidos vasculares). Los valores correspondientes de CI_{50} fueron 4,81 ± 0,37 y 1,46 ± 0,10 μM (n = 5), respectivamente.[9]

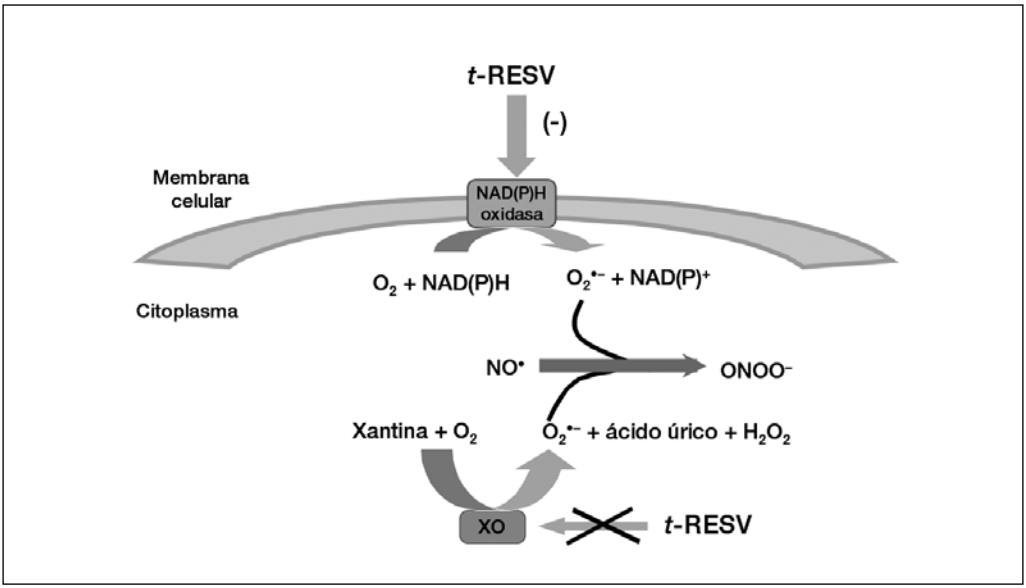


Figura 6. Esquema de la biosíntesis de $O_2^{\bullet-}$ en las células vasculares (células lisas y células endoteliales) mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa y de la XO. Como se describe en el texto y se indica en la figura, el t-*RESV disminuye la actividad de la NAD(P)H oxidasa, pero no modifica la de la XO.*

Efectos cardioprotectores derivados del incremento de las concentraciones de NO• producidas por el *t*-RESV

En resumen, los resultados anteriores demuestran que el efecto vasorrelajante característico dependiente del endotelio del *t*-RESV en la aorta de la rata parece deberse a un incremento de la actividad de la vía de la L-arginina-NO•-GMP_c, posiblemente mediante la inhibición de la actividad de la NADH/NADPH oxidasa vascular, la subsiguiente disminución de la biosíntesis celular basal de $O_2^{\bullet-}$ y, por consiguiente, de la inactivación del NO• por dichos radicales, lo que da lugar a un incremento de las concentraciones de NO•. En este sentido, es preciso comentar que dicho incremento de las concentraciones de NO• en el organismo tiene efectos cardiosaludables por diversos mecanismos:

1) Potente actividad vasodilatadora (Fig. 2), altamente beneficiosa en la cardiopatía isquémica y en los efectos antianginosos de la nitroglicerina y otros nitrovasodilatadores donadores de NO•.[11]
2) Potente efecto inhibidor de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes, lo cual va a ser clave para la prevención de la aterosclerosis, esto es, para inhibir la formación de ateromas. Como se puede ver en la Fig. 7, un grupo de glóbulos blancos (los monocitos), al atravesar los poros existentes entre las uniones de las células endoteliales, pueden pasar al subendotelio, es decir, al espacio existente entre las células endoteliales y las células vasculares lisas de la capa media del vaso. Ya en el espacio subendotelial, fuera del torrente circulatorio, los monocitos se convierten automáticamente en células fagocíticas, que son los macrófagos. Por otro lado, las LDL, cuando están circulando, sufren una serie de procesos de oxidación (normalmente por la acción de distintos radicales libres producidos en condiciones patológicas) y se transforman en LDL oxidadas (LDL-OX). A diferencia de las LDL normales, las LDL-OX son captadas por los

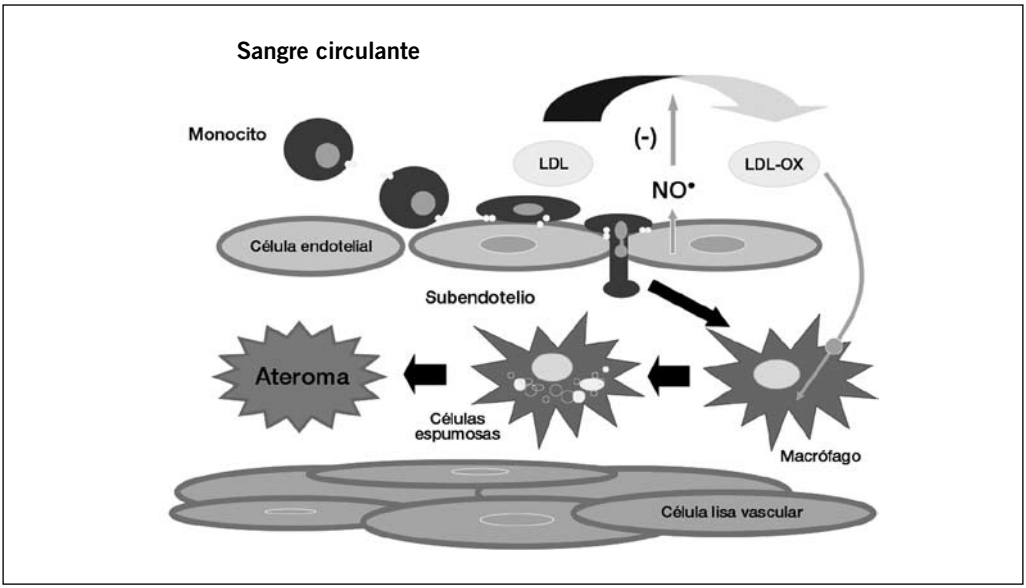


Figura 7. Representación esquemática de los efectos cardioprotectores del NO• derivados de la inhibición de la oxidación de las LDL (para más detalles ver el texto). LDL-OX = LDL oxidadas.

macrófagos de forma indiscriminada, con lo cual se forman las llamadas células espumosas porque son células cargadas de grasa. La aparición de estas células es el paso inicial para que se desarrolle la placa lipídica calcificada (ateroma) en la pared del vaso sanguíneo. Pues bien, como se ha comentado anteriormente, el NO• liberado de las células endoteliales es un potente inhibidor de la oxidación de las LDL, por lo cual éstas, al no estar oxidadas, no son captadas indiscriminadamente por los macrófagos derivados de los monocitos, no se transforman en células espumosas y, por consiguiente, no depositan grasa en la pared vascular y se previene la formación de la placa aterosclerótica.[18]

3) Potente efecto antiagregante plaquetario, impidiendo que se generen los trombos intraarteriales o intravasculares blancos, constituidos por masas blancas de plaquetas adheridas y agregadas a la placa aterosclerótica, que a medida que crece termina penetrando en la luz del vaso al perforar el endotelio vascular (Fig. 8).[11]

Conclusiones

Teniendo en cuenta los efectos cardioprotectores del NO• descritos anteriormente y asumiendo que la actividad de la ruta L-arginina-NO•-GMP_c parece ser baja y estar alterada (disminución de la síntesis de NO•/incremento de la producción de $O_2^{\bullet -}$) en las enfermedades del sistema cardiovascular, como la hipertensión y la aterosclerosis,[6,17] probablemente debido a una actividad incrementada de la NADH/NADPH oxidasa, si el *t*-RESV mostrase un comportamiento similar en los vasos sanguíneos humanos nuestros resultados permitirían sugerir que este compuesto polifenólico natural podría desempeñar un papel importante en los efectos cardioprotectores producidos a largo plazo por el consumo diario de moderadas cantidades de vino.

Como se puede comprobar, tanto los estudios funcionales realizados en la aorta aislada de rata como los realizados a escala subcelular y molecular han sido clave para poder llegar a la conclusión anterior. Por estos moti-

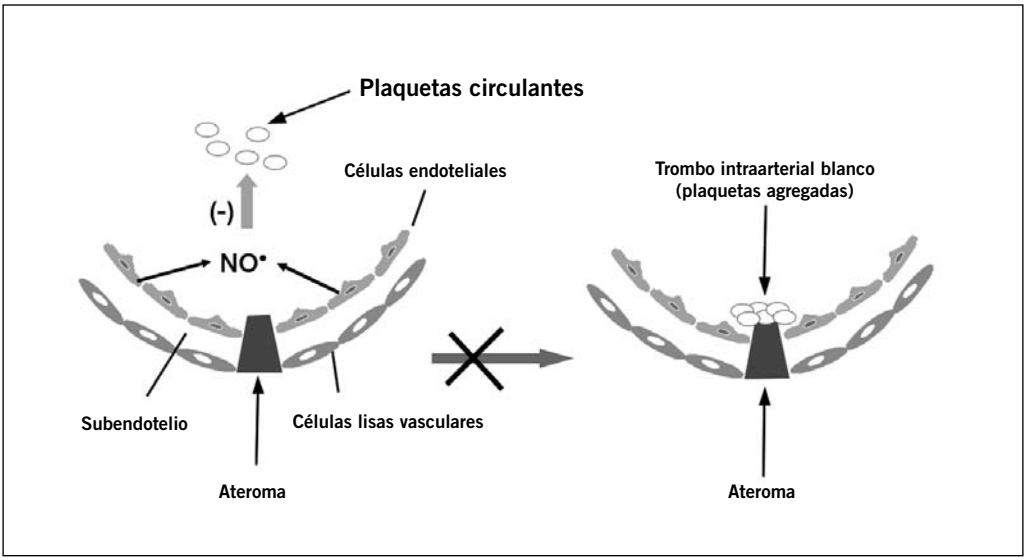


Figura 8. Esquema de los efectos inhibidores del NO• sobre la adhesión y la agregación de las plaquetas a la placa aterosclerótica.

vos, a pesar de que en la actualidad muchos farmacólogos sólo utilizan técnicas de biología molecular para generar sus resultados, a ser posible siempre se deberán realizar también simultáneamente el mayor número de experimentos *in vivo* e *in vitro* sobre tejidos aislados, células y fracciones subcelulares (con todas las ventajas e inconvenientes que cada uno de ellos lleva consigo). Solamente trabajando de esta forma podrá ser viable el estudio conjunto de los resultados obtenidos, su comparación y su posible extrapolación de unos tipos de experimentos a otros.

Ya para terminar, después de todo lo expuesto hasta aquí y ante la cuestión de si el vino es realmente recomendable, yo casi me atrevería a decir que dos o tres copitas diarias de vino pueden ser útiles para prevenir situaciones desagradables como un ataque de angina de pecho o un infarto de miocardio.

Agradecimientos

Los estudios expuestos en este trabajo han sido financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyectos SAF2000-0137 y SAF2002-0245), por la Consellería de Innovación, Industria e Comercio de la Xunta de Galicia (proyectos PGIDIT02BTF20301PR y INCITE07PXI203039ES), por el Ministerio de Sanidad y Consumo (FISS PI061537) y por la ayuda económica recibida con la concesión del Premio en Farmacología 2003 (Sociedad Española de Farmacología/Almirall-Prodesfarma).

El autor está muy agradecido a la Sociedad Española de Farmacología y a los laboratorios Almirall-Prodesfarma por haberle concedido el Premio en Farmacología 2003, así como a la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia por la ayuda concedida para la reducción de la actividad docente (curso académico 2007-2008) dentro del programa de promoción de intensificación de la actividad investigadora en el Sistema Universitario de Galicia (SUG).

BIBLIOGRAFÍA

1. St. Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. Lancet. 1979; 1:1017-20.
2. Renaud S., de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. Lancet. 1992;339:1523-6.

3. Arts IC, Hollman PCh. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. Am J Clin Nutr. 2005;81:317S-25S.
4. Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. Curr Opin Lipidol. 2005;16:77-84.
5. Zern TL, Fernández ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. J Nutr. 2005;135:2291-4.
6. Orallo F. Biological effects of *cis*- versus *trans*-resveratrol. En: Aggarwal BB, Shishodia S, editores (University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, USA). Oxidative stress and disease (series). 20. Resveratrol in Health and Disease. Boca Raton, USA: CRC Press; 2006. p. 577-600.
7. Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. Free Radic Res. 2006;40:1054-65.
8. Orallo F, Camiña M. Study of the endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilator effects of resveratrol in rat aorta. Br J Pharmacol. 1998;124:108P.
9. Orallo F, Álvarez E, Camiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P. The possible implication of *trans*-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. Mol Pharmacol. 2002;61:294-302.
10. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. Circ Res. 1983;53:557-73.
11. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999;39:191-220.
12. Alexander SPH, Mathie A., Peters JA. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 revision). Br J Pharmacol. 2007;150: S1-S168.
13. Eglème C, Godfraind T, Miller RC. Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. Br J Pharmacol. 1984;81:16-8.
14. Boulanger ChM, Morrison KJ, Vanhoutte P. Mediation by M_3-muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. Br J Pharmacol. 1994;112:519-24.
15. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. Ann Med. 1995;27:331-40.
16. Orallo, F. Comparative studies of the antioxidant effects of *cis*- and *trans*-resveratrol. Curr Med Chem. 2006;13:87-98.
17. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2007;87:245-313.
18. Stocker, R, Keaney, J.F. Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev. 2004;84:1381-1478.

DISCUSIÓN

S. Erill: ¿Qué concentraciones de *t*-RESV se consiguen en el organismo tras la ingesta diaria de tres copas de vino?

F. Orallo: Se consiguen concentraciones en sangre muy parecidas a las que acabo de exponer. El grupo de Alberto Bertelli, de la Universidad de Milán, ha demostrado que el *t*-RESV se va acumulando también en diferentes tejidos del organismo (hígado, riñón y corazón). Además, hay que tener en cuenta que las concentraciones de *t*-RESV varían mucho dependiendo del tipo de vino que se ingiera. El vino tinto, en líneas generales, por la forma de preparación, contiene más *t*-RESV que el vino blanco. Por consiguiente, después de un consumo moderado y diario, con el vino tinto se alcanzan concentraciones plasmáticas más altas de *t*-RESV que con el vino blanco.

M.J. Sanz: Parte de los efectos del *t*-RESV son revertidos por la L-NAME (inhibidor de las isoformas de la NOS). ¿Qué ocurre con la ciclooxigenasa (COX)?

F. Orallo: Se ha descrito en distintas publicaciones que el *t*-RESV inhibe la actividad enzimática de las isoformas de la COX, fundamentalmente la de la COX-1. Como parece que la investigación de la actividad farmacológica de los isómeros del resveratrol y de sus derivados no interesa en este país, porque me están denegando todos los proyectos que solicito, en la actualidad en Santiago de

Compostela nos dedicamos a evaluar, entre otras cosas, los efectos sobre la COX-1 y la COX-2 de nuevos fármacos antiinflamatorios de origen natural y sintético. Al haber tenido que poner en marcha y a punto las correspondientes técnicas de medida de la actividad enzimática, hemos aprovechado para realizar algunos experimentos con el *t*-RESV y hemos observado que dicho polifenol inhibe la COX-1 a concentraciones similares a las que tiene efectos vasorrelajantes en la aorta de rata.

M.J. Sanz: En colaboración con el Dr. Orallo hemos observado claros efectos anitiinflamatorios en un modelo crónico de inflamación en ratas tratadas durante un mes con 15 mg de *t*-RESV por vía oral. Y respondiendo al Dr. Erill, creo que hay vinos que llegan a concentraciones de *t*-RESV de 75 mg por litro.

A.M. Planas: ¿Creéis que podría haber un beneficio agudo del tratamiento con *t*-RESV? ¿Dosis más altas podrían tener algún efecto no deseado?

F. Orallo: Hasta ahora sólo se han descrito en humanos efectos beneficiosos en tratamientos crónicos y se han iniciado muy pocos estudios clínicos debido a que, al ser un compuesto polifenólico de origen natural, el *t*-RESV no se puede patentar. De todos modos, en Estados Unidos y Canadá se están realizando ensayos clínicos con el *t*-RESV y con algunos derivados sintéticos para el tratamiento del cáncer de colon y de infecciones recurrentes por el VHS-1 (creo que tales ensayos se encuentran en las fases I/II). Además, el grupo de David Sinclair, de la Universidad de Harvard, está intentando conseguir financiación para realizar estudios clínicos relacionados con los efectos beneficiosos que el *t*-RESV tiene sobre el envejecimiento, fundamentalmente por ser un potente activador de la actividad enzimática de las sirtuinas. Por otro lado, al igual que los estudios de toxicidad realizados en la fase I de los ensayos clínicos que he citado anteriormente, los pocos estudios toxicológicos aislados llevados a cabo hasta la fecha en humanos demuestran que el *t*-RESV es seguro y que no ocasiona reacciones adversas cuando se administra en dosis únicas de 0,5, 1, 2,5 y 5 g por vía oral a personas sanas de aproximadamente 70 kg de peso.

J.M. Baeyens: El resveratrol y los antiinflamatorios no esteroideos producen un efecto analgésico mediado por el óxido nítrico, el GMP_c y la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP. ¿En este modelo también se ha observado la apertura de los canales de potasio? ¿Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos ejercen un efecto similar al del resveratrol?

F. Orallo: No hemos realizado ningún estudio sobre esto.

A.G. Fernández: Teniendo en cuenta que el vino supone la ingesta concomitante de etanol, lo que puede estar contraindicado en un número apreciable de casos, ¿podría comentar qué otros alimentos contienen *t*-RESV?

F. Orallo: Cacahuetes, arándanos y moras de moral, principalmente.

F. Pérez-Vizcaíno: Nosotros trabajamos con flavonoides y hemos observado que en plasma se encuentran como glucosulfoconjugados, con lo cual hemos tenido que repetir la farmacología basándonos en estos metabolitos. ¿Sucede lo mismo con el resveratrol?

F. Orallo: Prácticamente no se han realizado estudios de este tipo en humanos. De todas formas, como sucede con otros fármacos, aunque se ha descrito que el *t*-RESV genera varios metabolitos, entre ellos los correspondientes glucurónidos y sulfatos, nunca se produce una biotransformación instantánea, con lo cual inicialmente también habrá en sangre *t*-RESV sin metabolizar. Además, creo que dichos glucurónidos y sulfatos conservan en parte la actividad farmacológica que tiene el compuesto natural. En el vino, aparte del *t*-RESV se encuentran presentes polímeros

y glucósidos de este polifenol. Dichos derivados son hidrolizados a *t*-RESV en el tubo digestivo, el cual luego es absorbido como tal. Esto contribuye a que en plasma se alcancen concentraciones de *t*-RESV próximas a las terapéuticas después de un consumo diario de cantidades moderadas de vino.

A.M. Planas: ¿El *t*-RESV se acumula en el cerebro?

F. Orallo: Está publicado que atraviesa la barrera hematoencefálica y que accede al SNC, pero me parece que no se ha descrito que el *t*-RESV se acumule en el cerebro.

J.M. Baeyens: El equivalente en el uso clínico del *t*-RESV serían los nitratos, y con un uso continuado producen tolerancia. ¿Se ha descrito algo similar con el *t*-RESV?

F. Orallo: Que yo sepa, no se ha descrito que el *t*-RESV produzca tolerancia.

P. D'Ocón: La tolerancia que generan los nitratos se debe en gran parte al metabolismo previo que sufren, y quizá el mecanismo no sea comparable al del resveratrol, lo cual justificaría que éste no presente esa tolerancia por actuar directamente, sin necesidad de una metabolización previa.

La inflamación como diana terapéutica en la isquemia cerebral

A.M. Planas[1] y E. Vila[2]
[1]Departament d'Isquemia Cerebral i Neurodegeneració, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona;
[2]Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

Resumen: *La inflamación contribuye al progreso de la lesión isquémica y al deterioro neurológico en el ictus, una enfermedad aguda en la cual se interrumpe o disminuye la irrigación del cerebro. En esta respuesta inflamatoria intervienen señales extracelulares (como citocinas, quimiocinas y proteinasas de la matriz extracelular), se activan células gliales y vasculares, e infiltran leucocitos. Los neutrófilos son los primeros leucocitos infiltrantes que aparecen en las primeras horas después del inicio de la isquemia, y liberan enzimas citotóxicas y proteinasas de la matriz extracelular, generando estrés oxidativo. La posterior infiltración de monocitos y linfocitos también contribuye a la exacerbación de la isquemia, Además, la lesión cerebral provoca la liberación de catecolaminas y corticosteroides al torrente circulatorio, que pueden afectar al sistema inmunitario y favorecer una respuesta antiinflamatoria de tipo Th2. Dicha respuesta podría frenar la inflamación cerebral al limitar el proceso inflamatorio local al tejido isquémico, a expensas de inducir un síndrome de inmunodepresión que favoreciera que los sujetos isquémicos fueran más susceptibles a contraer infecciones. El estrés oxidativo y la inflamación se han identificado como posibles dianas para el tratamiento del ictus y puede intervenirse farmacológicamente, aunque aún queda por aclarar de qué modo el estado de inmunosupresión inducido por la respuesta antiinflamatoria podría aumentar el riesgo de contraer infecciones en los pacientes de ictus.*

Palabras clave: Ictus – Inflamación – Estrés oxidativo – Inmunosupresión.

Ictus y lesión isquémica

El ictus es una enfermedad aguda en la cual se interrumpe o disminuye la irrigación normal del cerebro o de una zona de él, y a menudo es causa de discapacidad permanente o muerte. El ictus es muy frecuente en nuestra sociedad y es la enfermedad neurológica que causa mayor número de ingresos hospitalarios. A pesar de que el ictus se produce generalmente en personas de edad avanzada, también puede afectar a personas más jóvenes en función de diversos factores de riesgo. El ictus isquémico es el más frecuente y en él nos centraremos en este trabajo. Se han desarrollado modelos animales que principalmente se basan en ocluir la arteria cerebral media accediendo directamente a ella (craneotomía),[1] por oclusión mecánica introduciendo un filamento por la carótida interna (intraluminal),[2] o generando trombos (tromboembólico).[3] Estos modelos se asemejan en gran medida a la enfermedad en cuanto inducen una interrupción brusca del flujo sanguíneo cerebral, pero aun así están lejos de la patología humana porque frecuentemente se realizan en animales jóvenes y sanos, desprovistos de

los factores de riesgo que suelen acompañar al ictus. A modo de ejemplo, la hiperglucemia en fase aguda de la isquemia aumenta la infiltración de neutrófilos, el estrés oxidativo, la liberación de corticosteroides y la glucosilación de proteínas, factores que exacerban la lesión isquémica;[4] y la lesión es más grave en los animales hipertensos.[5] De todos modos, los modelos animales de isquemia cerebral permiten obtener una información valiosísima sobre los mecanismos moleculares implicados en la muerte neuronal y en el desarrollo del infarto.

La isquemia es un fenómeno agudo, pero la lesión cerebral es un proceso dinámico que se genera de forma progresiva en las horas y días que siguen al inicio de la isquemia.[6] El núcleo isquémico, la zona más afectada que va a sufrir necrosis, está rodeado por la penumbra, que se asocia a tejido en riesgo de desarrollar muerte neuronal. En la penumbra, la muerte neuronal tiene un componente apoptótico[7,8] y progresa de forma más lenta. Este concepto tiene relevancia clínica no sólo porque se cree que la penumbra puede responder a tratamientos farmacológicos y es una diana terapéutica, sino también porque esta zona se puede identificar mediante técnicas de diagnóstico por imagen. La isquemia induce fallo metabólico, liberación masiva de glutamato, aumento de calcio intracelular, excitotoxicidad y fallo en las bombas de membrana, lo que provoca edema citotóxico.[9] Las células no pueden mantener el potencial de membrana, afectando a la viabilidad celular y provocando necrosis. En los animales este proceso se puede prevenir o atenuar administrando antagonistas de los receptores del glutamato o inhibiendo la entrada de calcio, entre otras estrategias. Sin embargo, éstas sólo son efectivas cuando se administran antes o inmediatamente después del inicio del proceso isquémico, y por ello en la práctica clínica es muy difícil detener esta cascada inicial de señales.

Reperfusión, trombólisis y papel del estrés oxidativo

Actualmente el único tratamiento aprobado en Europa y Estados Unidos para el ictus es la trombólisis con activador tisular del plasminógeno (rtPA, alteplasa), con una ventana terapéutica de tres horas. Efectivamente, la reperfusión del tejido isquémico es la mejor forma de proteger el cerebro. Sin embargo, la reperfusión comporta riesgos, como la hemorragia, y puede tener efectos no deseados. En otros órganos, como el corazón, existe el denominado daño por reperfusión que está mediado por el estrés oxidativo, pero en el cerebro la posible magnitud y contribución de este efecto no están bien identificadas. Estudios experimentales han mostrado la eficacia de diversos agentes antioxidantes en la isquemia/reperfusión cerebral. Sin embargo, en ensayos clínicos no se han obtenido resultados favorables con antioxidantes. El ejemplo más reciente es el ensayo clínico SAINT II con NXY-059, secuestrador de radicales libres, que ha dado un resultado neutro[10] a pesar de estar avalado por un ensayo clínico previo (SAINT I)[11] y por datos preclínicos sólidos. Basándonos en un estudio preclínico que realizamos[3] y en datos clínicos, nuestro equipo de investigación clínica ha llevado a cabo recientemente un ensayo de fase II con un antioxidante endógeno, el ácido úrico, combinado con rtPA, que ha demostrado seguridad.[12] Próximamente se iniciará un estudio académico multicéntrico de fase III para determinar la eficacia de este tratamiento combinado. La combinación de antioxidantes con trombolíticos podría reducir la tasa de eventos no deseables (hemorragia y muerte) inducidos por estos últimos, y alargar la ventana terapéutica para poder tratar un mayor número de pacientes.

Contribución de la inflamación a la lesión isquémica

La necrosis provoca la liberación del contenido celular al medio extracelular y una respuesta inflamatoria que induce activación de las células gliales del entorno e infiltración leucocitaria.[13,14] Este proceso se puede monitorizar *in vivo* mediante técnicas de imagen.[15] Los primeros leucocitos infiltrantes son los neutrófilos, que aparecen en las prime-

ras horas después del inicio de la isquemia y presentan un pico a las 24-48 horas.[13-15] Los neutrófilos liberan enzimas citotóxicas, como la mieloperoxidasa, y proteinasas de la matriz extracelular, como la MMP-9,[16] y generan estrés oxidativo. En una segunda fase (3-4 días) infiltran monocitos y linfocitos. Los monocitos activados adquieren propiedades fagocíticas de células macrofágicas y eliminan detritus celulares. La infiltración de células T CD4+ y CD8+ también tiene relevancia en la isquemia cerebral y participa en la lesión.[17] Por tanto, la inflamación contribuye a la progresión de la lesión y exacerba el efecto de la isquemia. [9,14]

Citocinas

La isquemia aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas capaces de inducir reactividad glial y atraer diferentes tipos de leucocitos hacia la zona de lesión. Ya en las primeras horas después del inicio de la isquemia se libera factor de necrosis tumoral (TNF-α), interleucinas (IL) y distintos tipos de interferón (IFN),[18] así como quimiocinas. Los títulos de citocinas también aumentan en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo, según se ha demostrado en animales de experimentación y en pacientes de ictus. Así, concentraciones sanguíneas elevadas de IL-6 y de TNF-α se correlacionan con deterioro neurológico.[19] Sin embargo, la administración intracerebral de IL-6 tiene efectos neuroprotectores en animales,[20] y también se reconoce el papel dual del TNF-α[21] en función del receptor sobre el cual actúa. La concentración, el lugar y el tiempo de acción de las citocinas pueden desempeñar un papel determinante en estos efectos aparentemente contradictorios. En cambio, concentraciones bajas de la citocina antiinflamatoria IL-10 en pacientes se relaciona con mal pronóstico,[22] lo que concuerda con resultados experimentales que muestran efectos beneficiosos de la IL-10.[23]

Vías de señalización intracelular

Las citocinas se unen a receptores de membrana y activan vías de señalización intracelular múltiples y complejas, que interactúan provocando una respuesta celular. Mencionaremos dos vías que tienen un papel destacado en la isquemia: el NF-κB[24] y la JAK/STAT[25]. Ambas tienen en común el ser rápidamente activables por un estímulo extracelular, ya que los factores implicados están frecuentemente presentes en el citoplasma, y responden a proteínas cinasas acopladas a receptores de membrana que inducen la liberación de factores proinflamatorios. La activación del NF-κB induce TNF-α y moléculas de adhesión, entre otras. En el caso de JAK/STAT, las cinasas JAK fosforilan en residuos tirosina proteínas de la familia STAT, que después forman homodímeros o heterodímeros, translocan el núcleo y activan la transcripción génica. La JAK/STAT se activa tras la isquemia,[25-28] pero el mecanismo molecular subyacente no se conoce. En cultivos de astrocitos hemos podido comprobar la función fundamental del estrés oxidativo y de ciertas citocinas en la activación de la JAK/STAT.[29,30] Estas vías de señalización también se activan en respuestas de inmunidad innata mediadas por los receptores del tipo Toll-like (TLR) y por varios de sus agonistas (Gorina et al., observaciones no publicadas), como por ejemplo el lipopolisacárido bacteriano, que actúa por vía de TLR-4. Recientemente se ha demostrado que la isquemia cerebral produce lesiones menores en animales deficientes en TLR-4.[31] Por tanto, en la isquemia, la inflamación y la inmunidad innata están íntimamente relacionadas.

Moléculas de adhesión

La infiltración leucocitaria está mediada por la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular cerebral, y dichas moléculas se han propuesto como diana de intervención terapéutica. Algunas de estas moléculas son inducibles y responden a señales intracelulares proinflamatorias. Así, la ICAM-1, a la cual se reconoce un papel importante en la infiltración de neutrófilos, responde a la activación del NF-κB. En animales, el bloqueo de la ICAM-1 mediante anticuerpos impide la infiltración de neutrófilos al tejido después de

la isquemia[15] y ejerce un efecto beneficioso en la isquemia/reperfusión.[32] Estos resultados preclínicos positivos promovieron un ensayo clínico en pacientes de ictus con enlimomab, un anticuepo anti-ICAM-1. Sin embargo, este estudio resultó negativo.[33]

En nuestro laboratorio bloqueamos otra molécula de adhesión inducible, la VCAM-1, que participa en la infiltración de monocitos. La administración de anticuerpos bloqueantes contra VCAM-1 redujo la infiltración de macrófagos al tejido, pero no impidió de forma global la infiltración leucocitaria.[2] Más aún, esta estrategia no disminuyó el volumen del infarto ni atenuó el déficit neurológico.[2] Tales resultados muestran que la regulación de la infiltración leucocitaria es compleja y que la intervención sobre un único proceso es insuficiente, o puede alterar el equilibrio preexistente entre señales y tener consecuencias negativas.

Alteración del sistema inmunitario

El SNC y el sistema inmunitario están estrechamente conectados.[34] Así, una situación de estrés o una lesión cerebral aguda provocan liberación de corticosteroides y catecolaminas al torrente sanguíneo.[34] Los linfocitos tienen receptores adrenérgicos, y las catecolaminas promueven la apoptosis de linfocitos T *naïve* y Th1, mientras que potencian una respuesta antiinflamatoria de tipo Th2. Este efecto induce un estado de inmunosupresión que se ha demostrado que ocurre en la isquemia cerebral en animales de experimentación,[35,36] y datos obtenidos por nuestro equipo apoyan la existencia de dicho efecto también en los pacientes de ictus.[37,38] La inmunosupresión es causa de que los ratones isquémicos adquieran infecciones y mueran,[35] y se cree que puede ser la causa del elevado riesgo de contraer infecciones que tienen los pacientes de ictus.[38-40] Las citocinas plasmáticas también pueden tener un papel en este fenómeno, puesto que contribuyen a modular las respuestas Th1/Th2. Se ha propuesto que la respuesta antiinflamatoria asociada a un estado de inmunosupresión podría ser beneficiosa al limitar el proceso inflamatorio local al tejido isquémico, a expensas de que los sujetos isquémicos fueran más susceptibles a contraer infecciones, e incluso que si la infección se pudiera detectar precozmente, y tratar o incluso prevenir, el efecto global podría ser beneficioso.[38,40] Sin embargo, en pacientes no se ha podido demostrar el beneficio de la profilaxis con antibióticos para prevenir las infecciones tras un ictus.[41]

Efectos vasculares: citocinas y estrés oxidativo

La isquemia/reperfusión genera una respuesta inflamatoria local y sistémica asociada a la liberación de citocinas y radicales libres[9] que pueden influir en la reactividad vascular. Tanto las citocinas como los radicales libres se han relacionado con las disfunciones endoteliales observadas en diversas enfermedades cardiovasculares.[42,43] Tras el ictus se produce un aumento de la presión arterial, que aproximadamente en un tercio de los pacientes se mantiene hasta 10 días después del inicio de los síntomas neurológicos.[44] Los mecanismos implicados en la hipertensión observada después de un accidente vascular cerebral no están del todo dilucidados, aunque se ha sugerido la implicación del sistema nervioso simpático. Las arterias mesentéricas de resistencia participan de manera importante en la regulación del tono vascular y, en consecuencia, de la presión arterial. Por ello, las alteraciones en el tono vascular de estas arterias podrían desempeñar un papel importante en la progresión y en la patogenia de las enfermedades vasculares,[45] entre ellas el ictus. El tono de las arterias de resistencia depende de la relación entre diversos factores (vasoconstrictores y vasodilatadores) liberados por las células endoteliales y la noradrenalina liberada por estimulación simpática, que a su vez actúa sobre los receptores adrenérgicos de las células musculares lisas, produciendo vasoconstricción.

En nuestro laboratorio hemos observado que la incubación con citocinas afecta las

respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadores en las arterias mesentéricas de resistencia.[5,45,46] Puesto que el ictus produce cambios en la presión arterial, nos planteamos si la isquemia/reperfusión cerebral podría afectar las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras en las arterias mesentéricas de resistencia. Así, en ratas observamos que tras un periodo de oclusión (90 minutos) de la arteria cerebral media, seguido de reperfusión (24 horas), se produce un aumento de las citocinas circulantes acompañado por una clara disfunción endotelial, sin que se afecten las respuestas vasoconstrictoras mediadas por los receptores α-adrenérgicos. Estos cambios se asocian a aumentos en la producción de aniones superóxido y en la expresión de ciclooxigenasa-2. La disfunción endotelial fue revertida por la superóxido dismutasa y por la indometacina. Estos resultados nos llevan a proponer que una producción excesiva de aniones superóxido en las arterias mesentéricas de resistencia media la disfunción endotelial observada tras la isquemia cerebral, y que en este efecto podría estar involucrado un aumento de las citocinas circulantes.[47] Todo ello contribuiría a las alteraciones de la presión arterial observadas tras el ictus. Estos trabajos abren la puerta a nuevas investigaciones con fármacos que puedan modificar alguna de las dianas alteradas en el sistema nervioso periférico y contribuir, en un futuro, a paliar algunos de los efectos vasculares sistémicos tras el ictus.

Dianas terapéuticas

Basándonos en gran medida en estudios realizados por nuestros equipos de investigación, identificamos el estrés oxidativo y la inflamación como dianas terapéuticas para combatir la lesión isquémica (Fig. 1), y que avalan la combinación de trombolíticos y otros fármacos para tratar el ictus. La base

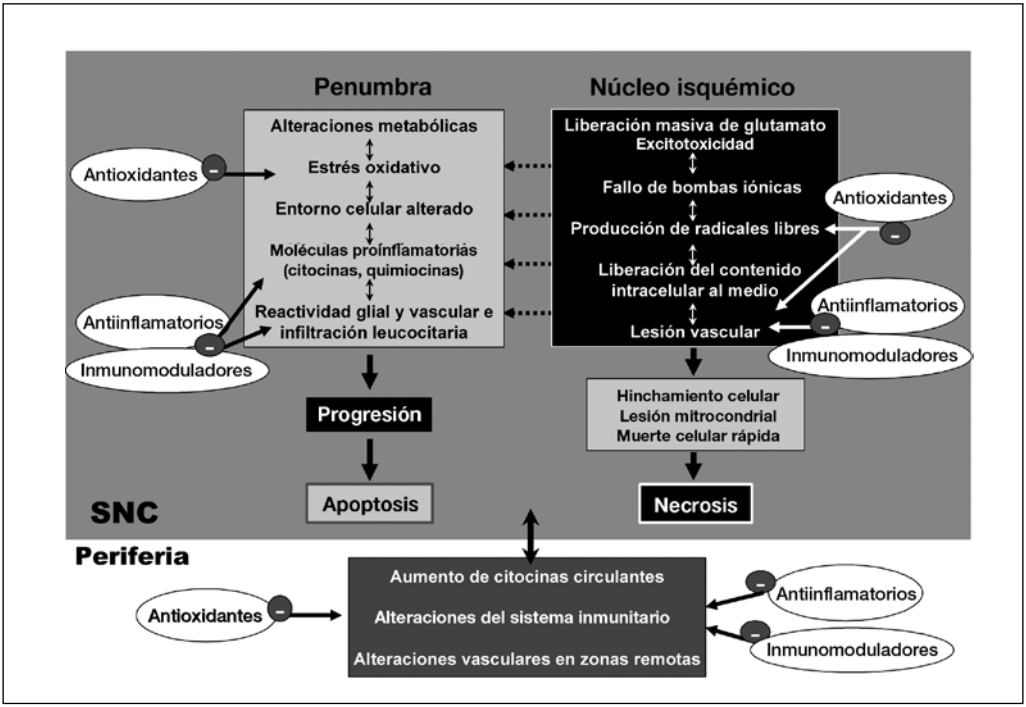


Figura 1. Posibles dianas de acción terapéutica en la isquemia cerebral.

de este planteamiento es que la reperfusión puede rescatar el tejido en riesgo (penumbra), pero puede inducir estrés oxidativo, activar vías proinflamatorias e inducir reactividad glial y vascular, y favorecer la infiltración de leucocitos. Se tienen datos que apoyan el uso de trombolíticos y antioxidantes, y muestran el efecto nocivo de la inflamación. Además, se han identificado respuestas sistémicas, vasculares e inmunitarias, que contribuyen al proceso patológico desencadenado por el ictus. Combatir la inflamación cerebral parece ser beneficioso para el tejido lesionado y para prevenir diversas alteraciones vasculares, pero queda por aclarar de qué modo potenciar las respuestas antiinflamatorias podría inducir o exacerbar la condición de inmunodepresión generada tras el ictus, y si este fenómeno podría incrementar el riesgo de infección y muerte en los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Planas AM, Soriano MA, Rodríguez-Farré E, Ferrer I. Induction of COX-2 mRNA and protein following transient focal ischemia in the rat brain. Neurosci Lett. 1995; 200:187-90.
2. Justicia C, Martín A, Rojas S, Gironella M, Cervera A, Panés J, et al. Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic damage either in rats or in mice. J Cereb Blood Flow Metab. 2006;26:421-32.
3. Romanos E, Planas AM, Amaro S, Chamorro A. Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-PA in a rat model of thromboembolic stroke. J Cereb Blood Flow Metab. 2007;27:14-20.
4. Martín A, Rojas S, Chamorro A, Falcón C, Bargalló N, Planas AM. Why does acute hyperglycemia worsen the outcome of transient focal cerebral ischemia? Role of corticosteroids, inflammation, and protein O-glycosylation. Stroke. 2006;37:1288-95.
5. Jiménez-Altayó F, Martín A, Rojas S, Justicia C, Briones AM, Giraldo J, et al. Transient middle cerebral artery occlusion causes different structural, mechanical, and myogenic alterations in normotensive and hypertensive rats. Am Physiol Heart Circ Physiol. 2007;293: H628-35.
6. Rojas S, Martín A, Justicia C, Falcón C, Bargalló N, Chamorro A, et al. Modest MRI signal intensity changes precede delayed cortical necrosis after transient focal ischemia in the rat. Stroke. 2006;37:1525-32.
7. Ferrer I, Friguls B, Dalfó E, Justicia C, Planas AM. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. Neuropathol Appl Neurobiol. 2003;29:472-81.
8. Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. J Neuropathol Exp Neurol. 2003;62:329-39.
9. Hossmann KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. Cell Mol Neurobiol. 2006; 26:1057-83
10. www.astrazeneca.com/pressrelease/5279.aspx
11. Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, Davalos A, Davis SM, Diener HC, et al. Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment (SAINT I) Trial Investigators. NXY-059 for acute ischemic stroke. N Engl J Med. 2006; 354:588-600.
12. Amaro S, Soy D, Obach V, Cervera A, Planas AM, Chamorro A. A pilot study of dual treatment with recombinant tissue plasminogen activator and uric acid in acute ischemic stroke. Stroke. 2007;38:2173-5.
13. García JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). Am J Pathol. 1994;144:188-99.
14. Hallenbeck JM. Significance of the inflamamtory response in brain ischemia. Acta Neurochir. Suppl 1996; 66:27-31.
15. Rojas S, Martín A, Arranz MJ, Pareto D, Purroy J, Verdaguer E, et al. Imaging brain inflammation with [(11)C]PK11195 by PET and induction of the peripheral-type benzodiazepine receptor after transient focal ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2007;27:1975-86.
16. Justicia C, Panés J, Solé S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, et al. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2003;23:1430-40.
17. Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. Circulation. 2006;113:2105-12.
18. Li HL, Kostulas N, Huang YM, Xiao BG, van der Meide P, Kostulas V, et al. IL-17 and IFN-

gamma mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. J Neuroimmunol. 2001;116:5-14.
19. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. Stroke. 2003; 34:671-5.
20. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1998;18:176-9.
21. Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. Nat Med. 2002;8:1363-8.
22. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. Stroke. 2003;34:671-5.
23. Ooboshi H, Ibayashi S, Shichita T, Kumai Y, Takada J, Ago T, et al. Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. Circulation. 2005;111:913-9.
24. Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. J Clin Invest. 2001;107:247-54.
25. Planas AM, Gorina R, Chamorro A. Signalling pathways mediating inflammatory responses in brain ischaemia. Biochem Soc Trans. 2006;341267-70.
26. Planas AM, Soriano MA, Berruezo M, Justicia C, Estrada A, Pitarch S, et al. Induction of Stat3, a signal transducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischaemia. Eur J Neurosci. 1996;82:612-8.
27. Planas AM, Justicia C, Ferrer I. Stat1 in developing and adult rat brain. Induction after transient focal ischemia. Neuroreport. 1997;8:1359-62.
28. Justicia C, Gabriel C, Planas AM. Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes. Glia. 2000;30:253-70.
29. Gorina R, Petegnief V, Chamorro A, Planas AM. AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. J Neurochem. 2005;92:505-18.
30. Gorina R, Sanfeliu C, Galitó A, Messeguer A, Planas AM. Exposure of glia to pro-oxidant agents revealed selective Stat1 activation by H2O2 and Jak2-independent antioxidant features of the Jak2 inhibitor AG490. Glia. 2007;55:1313-24.
31. Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. Circulation. 2007;115:1599-608.
32. Zhang RL, Chopp M, Jiang N, Tang WX, Prostak J, Manning AM, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. Stroke. 1995;26:1438-42.
33. Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. Neurology. 2001;57:1428-34.
34. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. Nat Rev Neurosci. 2005;6:775-86.
35. Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. J Exp Med. 2003;198:725-36.
36. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. J Immunol. 2006;176:6523-31.
37. Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Torres F, et al. Interleukin 10, monocytes and increased risk of early infection in ischaemic stroke. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2006;77:1279-81.
38. Chamorro A, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. Stroke. 2007;38:1097-103.
39. Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Gómez-Choco M, et al. Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke. J Neurol Sci. 2007;252:29-35.
40. Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, et al. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. Stroke. 2007;8(2 Suppl):770-3.
41. Vargas M, Horcajada JP, Obach V, Revilla M, Cervera A, Torres F, et al. Clinical consequences of infection in patients with acute stroke: is it prime time for further antibiotic trials? Stroke. 2006;37:461-5.

42. Dandona P, Ghanim H, Broops DP. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. J Hypert. 2007;25:731-41.
43. Xu S, Touyz RM. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. Can J Cardiol. 2006; 22:947-51.
44. Varon J, Marik PE. The diagnosis and management of hypertensive crises. Chest. 2000;118:214-27.
45. Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 288:H1016-21
46. Briones AM, Salaices M, Vila E. Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1β exposure in mesenteric resistance arteries. Mech Ageing Dev. 2005;126:710-21.
47. Martínez-Revelles S, Jiménez-Altayó F, Caracuel L, Pérez-Asensio FJ, Planas AM, Vila E. Endothelial dysfunction in rat mesenteric resistance artery after transient middle cerebral artery occlusion. J Pharmacol Exp Ther. 2008;325:363-9. Epub 2008 Feb 7.

DISCUSIÓN

M.I. Colado: ¿Tenéis experiencia en la utilización de inhibidores de la activación de la microglía sobre el volumen de infarto?

A.M. Planas: Con inhibidores directos no tenemos datos.

M.I. Colado: Has mostrado los resultados de administrar tPA tres horas después de la lesión. ¿Qué sucede si se administra más tarde?

A.M. Planas: A las cinco horas todavía se observan efectos protectores, pero normalmente van acompañados de más hemorragias y mortalidad. Por lo tanto, cuando no aparecen estos efectos negativos, el daño es menor.

S. Erill: ¿Funciona el precondicionamento isquémico en el cerebro?

A.M. Planas: Es un campo muy amplio y muy interesante, pero nosotros no lo abarcamos.

J.M. Vela: Si la inhibición de la infiltración de neutrófilos no disminuye el área infartada, pensando en una terapia antiinflamatoria, ¿cuál sería la diana celular?

A.M. Planas: Se han publicado resultados muy controvertidos sobre los neutrófilos. Al trabajar con animales neutropénicos, más susceptibles de morir, resulta difícil demostrar su posible beneficio. Además, los neutrófilos también desempeñan un papel sobre el sistema inmunitario. Éste es un nuevo campo en el cual ahora estamos entrando para estudiar de qué manera el daño cerebral afecta al sistema inmunitario.

C. Goicoechea: ¿Qué correlación existe entre la participación de la microglía y los astrocitos?

A.M. Planas: En una lesión isquémica muere tanto la microglía como los astrocitos. A medida que pasan los días, la microglía se activa mucho en el núcleo isquémico, donde adquiere una morfología indistinguible de los macrófagos que están infiltrando. La astroglía se sitúa alrededor de esta zona repleta de macrófagos y allí se genera la cicatriz glial. Si en el curso del tiempo se activan primero unas u otras... Probablemente ambas están respondiendo ante una lesión.

J.A. Armijo: ¿Los antiglutamérgicos serían válidos en la neuroprotección en un modelo de isquemia cerebral? ¿Podrían interaccionar con la inflamación?

A.M. Planas: Sí, para mí la combinación de fármacos es una buena estrategia. Lo que sucede es que es difícil trasladar a la clínica la prevención de la cascada de señales en que interviene el glutamato. Precisamente,

un estudio de un antagonista de NMDA en humanos se tuvo que interrumpir porque producía importantes efectos psicológicos no detectados previamente en animales.

M.J. Ramírez: Nosotros tenemos experiencia con la utilización de MK801, un antagonista de NMDA, en el animal de experimentación, y ciertamente produce problemas cognitivos terribles acompañados de un síndrome motor imposible de discernir del cognitivo, de modo que en la prueba del laberinto acuático de Morris no se logra diferenciar si el animal no alcanza la plataforma porque no la distingue o porque está tan incoordinado que es incapaz de nadar correctamente.

A.M. Planas: Creo que lo que acabas de mencionar es un ejemplo muy claro de uno de los problemas que tenemos en experimentación. A veces observamos efectos a los que no damos importancia y luego tienen una gran repercusión en otra investigación. Es obligatorio estar bien alerta ante aspectos que a lo mejor no nos convienen para publicar el artículo, pero que no dejan de ser muy relevantes para la investigación en general.

J.M. Baeyens: Si existen cambios motores muy evidentes y otros cognitivos muy sutiles, la utilización de la escala para valorar la eficacia funcional parece ser clave.

A.M. Planas: Sí, la alteración motora es tan importante que enmascara los problemas cognitivos. Puede ser que las pruebas de resonancia funcional sean una forma más objetiva de valoración, pero todavía no se ha estudiado convenientemente.

J. Llenas: ¿Las ratas que utilizáis tienen el polígono de Willis preservado?

A.M. Planas: Sí, está preservado, pero esto no impide que se induzca isquemia focal cuando se ocluye la arteria cerebral media. En cambio, para realizar isquemia global utilizamos jerbos porque tienen poca comunicación entre las arterias vertebrales y las carótidas, de modo que ocluyendo únicamente las carótidas se produce una isquemia global de la parte anterior del cerebro. Si no fuese así, gracias al polígono de Willis existiría irrigación suficiente y no se produciría la isquemia, por lo que en la rata, para inducir isquemia global, es necesario ocluir las arterias vertebrales además de las carótidas.

Nuevos modelos funcionales en inflamación. Aplicaciones en patología pulmonar

M.J. Sanz
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia-EG.

Resumen: *Diferentes enfermedades pulmonares como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el daño pulmonar agudo ocasionado por endotoxemia, se caracterizan por tener un proceso inflamatorio asociado, el cual contribuye a la disfunción de las vías aéreas. Actualmente, el tratamiento del asma se basa principalmente en la administración de corticosteroides inhalados junto con agonistas* β_2 *adrenérgicos. En el caso de la EPOC, diversos ensayos clínicos han mostrado la ineficacia de estos grupos farmacológicos y aún no existe una terapia adecuada para su tratamiento; además, son de sobra conocidos los numerosos efectos secundarios que puede ocasionar el tratamiento crónico con corticosteroides. Por ello, existe un creciente interés en la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios para estas enfermedades. Desde hace algunos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio del efecto de los inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (PDE4), de los antagonistas de algunas moléculas de adhesión y de los macrólidos sobre la acumulación leucocitaria. Mediante microscopia intravital, técnica que permite evaluar* in vivo *los procesos de infiltración leucocitaria, junto con estudios inmunohistoquímicos y citometría de flujo, hemos podido investigar parte del mecanismo por el cual estos grupos farmacológicos podrían mejorar la disfunción de las vías aéreas. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos puesto a punto una técnica* in vitro*, la cámara de flujo, que nos permite evaluar el efecto de diversos fármacos en las mismas circunstancias que estudia la microscopia intravital, pero utilizando endotelio y leucocitos humanos.*

Palabras clave: Leucocito – Endotelio – Vías aéreas – Microscopia intravital – Moléculas de adhesión.

Introducción

Diversas enfermedades pulmonares, como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el daño pulmonar agudo ocasionado por endotoxemia, se caracterizan por tener un proceso inflamatorio asociado, el cual contribuye a la disfunción de las vías aéreas. En el asma existen numerosas evidencias que sugieren la participación directa de los eosinófilos infiltrados en el exceso de secreción mucosa y la disfunción de las vías aéreas asociada a esta enfermedad, mediante la secreción de proteínas tóxicas contenidas en sus gránulos y de diferentes mediadores inflamatorios.[1] Así, existe una acumulación peribronquial de leucocitos, principalmente eosinófilos y linfocitos; estos últimos, con la producción de citocinas Th2, como las interleucinas (IL) 4, 5 y 13, median la acumulación y la activación de los eosinófilos.[2]

Por otro lado, una de las características comunes entre los pacientes sépticos y los modelos animales de sepsis es que, independien-

temente del órgano en que se origine la sepsis, son los pulmones los primeros en fallar.[3] El secuestro de neutrófilos por la microcirculación pulmonar y su activación parecen constituir un evento clave en el daño pulmonar agudo. En este caso son los neutrófilos, cuando se activan, la fuente de proteasas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores inflamatorios que pueden contribuir al daño tanto del endotelio como del epitelio alveolar.[4]

Finalmente, la EPOC también se caracteriza por una progresiva e irreversible disminución de la función pulmonar asociada a una anormal respuesta inflamatoria de las vías respiratorias ante partículas nocivas. En general, los pacientes presentan como característica dominante bronquitis crónica o enfisema debido a la destrucción y el colapso de los alvéolos terminales. En la actualidad se considera a la EPOC como una enfermedad inflamatoria pulmonar de tipo neutrofílico, que se perpetúa, en gran parte, por los macrófagos, las células epiteliales y posiblemente los linfocitos T CD8+, por lo que es completamente diferente a la inflamación que se observa en los asmáticos.[5]

El endotelio vascular forma una barrera activa entre el torrente sanguíneo y el espacio extravascular, el cual participa en la regulación del tráfico leucocitario y en el transporte de macromoléculas hacia el compartimiento extravascular.[6-8] Una de las primeras etapas del proceso inflamatorio la constituye la interacción de los leucocitos y el endotelio inducida por diferentes estímulos, que da lugar a la extravasación leucocitaria hasta el foco inflamado. Estas interacciones son particularmente importantes en la microcirculación pulmonar, ya que el pulmón es considerado un órgano muy sensible al daño que se produce como consecuencia de estos procesos.[9] Tales acontecimientos están mediados por la interacción, de manera concertada, de las moléculas de adhesión (MAC) presentes en el endotelio vascular con sus correspondientes ligandos en la célula leucocitaria.[8,10,11] El proceso se inicia por una interacción débil y transitoria denominada rodamiento; el rodamiento y la liberación de factores quimiotácticos provoca la activación leucocitaria, a continuación se produce la adhesión firme al endotelio y, finalmente, la migración leucocitaria, que puede ser paracelular o transcelular.[6,8,11,12] Las MAC se dividen en varias subfamilias en función de su estructura; entre las que participan en las interacciones leucocito-endotelio encontramos a las selectinas, las integrinas, las sialomucinas y las tipo inmunoglobulina.[6,8,11]

Por consiguiente, un posible blanco de actuación para inhibir o detener el desarrollo de la disfunción de las vías aéreas pasa por entender el proceso inflamatorio asociado a cada una de estas enfermedades. De esta forma, si se controla el proceso inflamatorio en los estadios iniciales de la enfermedad, impidiendo la acumulación de las principales células leucocitarias implicadas, se podrán llevar a cabo nuevas estrategias terapéuticas. Además, en el caso de la EPOC, diversos ensayos clínicos han mostrado la ineficacia de los corticosteroides y aún no existe un tratamiento adecuado para ella,[13-16] y por otro lado son de sobra conocidos los numerosos efectos secundarios que puede ocasionar la administración crónica de corticosteroides. Por ello, existe un creciente interés en la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios para el tratamiento de la patología pulmonar. Desde hace algunos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio y el mecanismo de acción de la actividad antiinflamatoria de los inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (PDE4), de los antagonistas de algunas moléculas de adhesión y de los macrólidos como posibles alternativas terapéuticas para la disfunción de las vías aéreas asociada a diversas enfermedades pulmonares.[17-20] En este capítulo describiremos algunos de los nuevos modelos funcionales, tanto *in vivo* como *in vitro*, que hemos empleado para tal fin.

Material y métodos

Modelos in vivo: *microscopia intravital*

Las preparaciones experimentales utilizadas en estos estudios son similares a las descritas previamente[17,21] para el estudio de la infiltración leucocitaria en la microcirculación mesentérica de la rata o en el cremáster del ratón.

Los animales son anestesiados y sus arterias carótidas derechas canuladas para monitorizar la presión arterial media (PAM) con un transductor de presión. Un segundo catéter se introduce en la vena yugular izquierda para permitir la administración intravenosa de distintas sustancias (anestesia, fármacos o anticuerpos monoclonales). Según el caso, una porción de la microcirculación mesentérica de la rata o del cremáster del ratón se exterioriza sobre un soporte y se coloca en un pedestal transparente que permite la transiluminación de un área de 2 cm^2 de tejido. El territorio vascular expuesto es perfundido continuamente con una solución tampón bicarbonatada a 37 ºC y a un pH de 7,4. La preparación se observa con un microscopio ortostático, y con la ayuda de una cámara de vídeo montada sobre él se proyectan las imágenes en un monitor a color y se graban en un magnetoscopio para su análisis posterior.

Para realizar el estudio se seleccionan vénulas de 25 a 40 µm de diámetro. Para la medida del diámetro vascular se emplea un video *caliper,* y la velocidad de los glóbulos rojos (V_{rbc}) en el torrente sanguíneo se determina utilizando un *optical Doppler velocimeter*. El flujo sanguíneo medio se determina mediante la aplicación de diversos cálculos matemáticos, al igual que el *shear rate*.

El número de leucocitos en fase de rodamiento, adheridos y emigrados se determina posteriormente mediante análisis de las imágenes grabadas en vídeo. Se define un leucocito en fase de rodamiento cuando se mueve a una velocidad menor que la de los eritrocitos en el torrente circulatorio. La velocidad de rodamiento (V_{wbc}) se determina calculando el tiempo requerido por un leucocito en fase de rodamiento para recorrer 100 µm de microvaso, y se expresa en µm/s. El flujo de leucocitos en fase de rodamiento se calcula determinando el número de leucocitos que cruzan un punto de referencia en el vaso durante un minuto. Un leucocito se define como adherido al endotelio vascular si permanece estacionado durante 30 segundos o más. La adhesión leucocitaria se expresa como el número de leucocitos adheridos por 100 µm de vaso, y la migración leucocitaria como el número de glóbulos blancos emigrados por campo visual rodeando la vénula en estudio.

Medida de la permeabilidad vascular

Con la microscopia intravital también se puede medir la extravasación plasmática en las vénulas poscapilares del mesenterio de la rata o del cremáster del ratón.[20] Mediante la administración intravenosa de albúmina bovina marcada con FITC (25 mg/kg) y utilizando una cámara de fluorescencia se puede determinar la fluorescencia tanto en el espacio intravascular como en el extravascular. La imágenes se analizan posteriormente con un sistema de análisis de imágenes. El índice de albúmina extravasada, expresado en porcentaje, se determina mediante el siguiente cálculo matemático: índice de permeabilidad = (media de la fluorescencia en el intersticio – ruido de fondo)/(media de la fluorescencia en el vaso – ruido de fondo) x 100%.

Histología e inmunohistoquímica

La arcada del mesenterio o del cremáster en que se han realizado las diferentes medidas puede fijarse con paraformaldehído u otros reactivos, incluirse en parafina y seccionar muestras de 4 µm de espesor. Se puede realizar un estudio histológico, mediante tinción con hematoxilina/eosina, encaminado a determinar el subtipo de leucocito que interacciona con el endotelio, o bien se pueden realizar estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos específicos, encaminados a determinar la expresión de moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas por la acción de diferentes estímulos.

Modelos in vitro

Estudios con células endoteliales obtenidas a partir de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)

1) Obtención de HUVEC

Para la obtención de HUVEC se emplean cordones umbilicales de menos de 12 ho-

ras desde el parto, siguiendo un protocolo previamente descrito.[20] En el momento en que llegan a confluencia, tras el primer pase, ya están preparadas para realizar los diferentes protocolos experimentales.

2) Medida de la expresión de MAC en HUVEC

Las células son incubadas con medio (control) o con diferentes estímulos a diferentes concentraciones y durante distintos tiempos. En algunos experimentos, las células se emplean para la extracción de RNA mensajero (RNAm) y se determina la expresión de éste en las distintas MAC en estudio por técnicas de RT-PCR semicuantitativa.[20] Para la determinación del aumento de expresión de la proteína, los cultivos de HUVEC se dejan crecer hasta la confluencia en placas de 96 pocillos. Tras aplicar los diversos estímulos en presencia o ausencia de los fármacos en estudio, la expresión en la superficie celular de la MAC se realiza por ELISA siguiendo un protocolo descrito previamente.[20]

3) Medida de la adhesión estática de leucocitos a HUVEC

El subtipo de leucocito en estudio, neutrófilo, eosinófilo o mononuclear, es aislado de sangre periférica humana según protocolos ampliamente utilizados.[20,22,23] Por otro lado, las HUVEC se cultivan en monocapa y se incuban con distintos estímulos en presencia o ausencia de los fármacos en estudio. Los leucocitos se añaden a las células y, transcurridos 30 minutos, se lavan los pocillos para eliminar los leucocitos no adheridos. Las células adheridas se lisan y se cuantifican determinando la actividad mieloperoxidasa (MPO) para neutrófilos y mononucleares, o epoperoxidasa (EPO) si se trata de eosinófilos. El número de leucocitos adheridos por mm^2 de monocapa de HUVEC se calcula por extrapolación a partir de una curva patrón.[20,24]

4) Medida de la interacción leucocito-endotelio mediante un modelo dinámico *in vitro*

Las células endoteliales se dejan crecer hasta la confluencia tras un solo pase, se tripsinizan y, de nuevo, se dejan crecer durante 24-48 horas en una placa de 35 mm de diámetro sobre una base de fibronectina. Tras la estimulación de las HUVEC en presencia o ausencia de los fármacos en estudio y por el tiempo establecido, se sigue un proceso similar al descrito previamente.[23] Brevemente, la cámara de flujo Glycotech se ensambla y se dispone sobre un microscopio invertido de contraste de fases, el cual permitirá observar la monocapa de células endoteliales. Seguidamente se procede a la perfusión de una suspensión de leucocitos, previamente aislados, o de sangre entera durante 5 minutos, gracias a una jeringa conectada a una bomba Harvard que permite regular la velocidad de flujo, pudiendo mimetizar las condiciones del territorio vascular en estudio. Transcurrido este tiempo, con ayuda de una cámara de vídeo conectada a un monitor, se procede a la determinación del número de leucocitos en fase de rodamiento, adheridos y, en algunos casos, emigrados. Posteriormente, si se perfunde sangre entera, la placa se seca, fija y tiñe para realizar el recuento diferencial del subtipo de leucocito que ha interaccionado con el cultivo celular. El número de células se expresa por mm^2 de monocapa de HUVEC. Esta técnica es mucho más adecuada que la descrita con anterioridad, ya que reproduce más adecuadamente las condiciones fisiológicas.

Medida de la expresión de MAC en la superficie leucocitaria por citometría de flujo

La expresión de MAC en la superficie leucocitaria se realiza en sangre entera. Las muestras de sangre citratada (100 µl) se incuban con los fármacos en estudio a la concentración deseada durante 20 minutos a 37 °C. Posteriormente se aplica el estímulo durante el tiempo establecido y a continuación se añade el anticuerpo monoclonal frente a la MAC a determinar, marcado con un determinado fluorocromo, y se incuba durante otros 20 minutos más en hielo y a oscuras. Transcurrido este

tiempo, los glóbulos rojos se lisan y la muestra se fija en un sistema EPICS Q-PREP (Coulter Electronics). Posteriormente, todos los análisis se realizan en un citómetro de flujo EPICS XL-MCL (Beckman-Coulter), tal como se ha descrito previamente.[19,20]

Resultados

En este apartado mostraremos algunos de los resultados obtenidos con los modelos de inflamación descritos.

Efecto de TR14035 sobre la inflamación pulmonar inducida por ovoalbúmina en rata

TR14035 es un antagonista de dos moléculas de adhesión, $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$, y su efecto fue evaluado en un modelo experimental de asma alérgica en ratas Brown Norway (BN). Los animales fueron sensibilizados (SZ) o no (NS) con ovoalbúmina (OVA) y 21 días después expuestos al antígeno o a salino y divididos en cuatro grupos: control negativo (vehículo + salino; NS), control positivo (vehículo + antígeno inhalado; SZ) y tratados con el fármaco (NS + TR14035 y SZ + TR14035). TR14035 (3 mg/kg) se administró por vía oral una hora antes y cuatro horas después de la exposición al antígeno o a solución salina fisiológica. Los animales SZ no tratados mostraron un claro incremento en la hiperreactividad pulmonar a la 5-hidroxitriptamina (5-HT) respecto al grupo NS y no tratado (Fig. 1A). Además, no se hallaron diferencias en este parámetro entre los grupos NS tratados o no con TR14035. Sin embargo, la administración de este fárma-

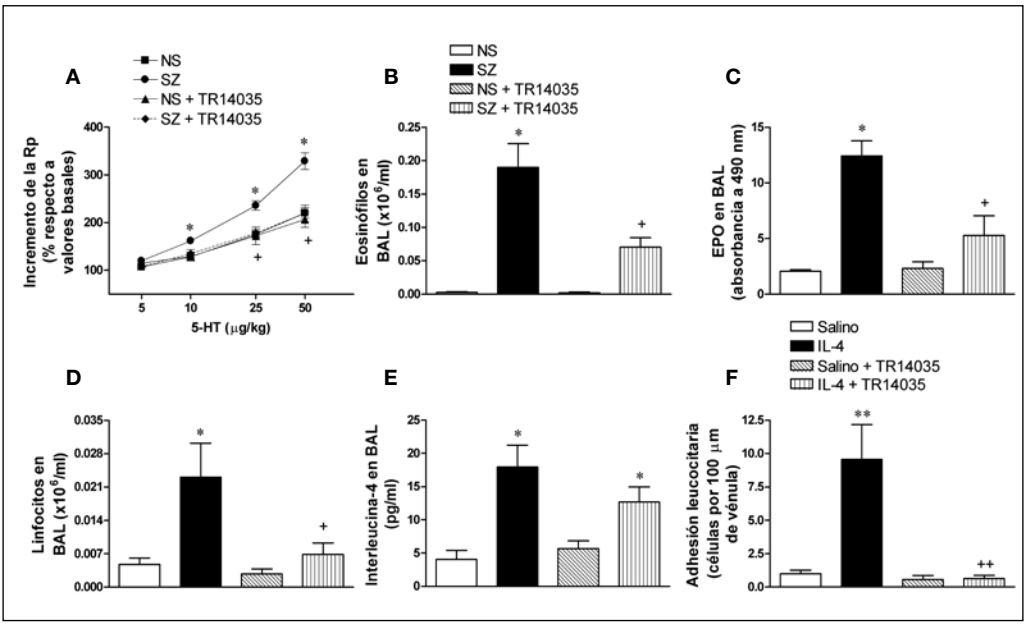


*Figura 1. Efecto de TR14035 sobre (A) la hiperreactividad pulmonar (Rp) a la 5-hidroxitriptamina (5-HT), (B) la infiltración eosinofílica en el lavado broncoalveolar (BAL), (C) la actividad epoperoxidasa en el BAL (EPO), (D) la infiltración linfocitaria en el BAL y (E) la concentración de IL-4 en el BAL de ratas no sensibilizadas (NS) y sensibilizadas (SZ), sometidas a exposición al antígeno. Los resultados se expresan como media ± ESM, n = 7 animales por grupo. *p <0.05 relativo a ratas NS; $^{+}$p <0.05 relativo a ratas SZ. (F) Efecto de TR14035 sobre la adhesión leucocitaria en las vénulas poscapilares mesentéricas de la rata inducida por IL-4. Los resultados se presentan como media ± ESM, n = 7-8 animales por grupo. **p <0.01 relativo al grupo de solución salina; $^{++}$p <0.01 relativo al grupo que recibió IL-4.*

co a ratas SZ redujo la hiperreactividad pulmonar a la 5-HT a los valores encontrados en los animales NS (Fig. 1A). Seguidamente se procedió al recuento leucocitario diferencial en el lavado broncoalveolar (BAL) de los distintos grupos a las 24 horas de la exposición al antígeno. Se observaron aumentos significativos en el número de eosinófilos, EPO y linfocitos en el grupo de animales SZ no tratados respecto al grupo NS (Fig. 1B, C y D). La administración de TR14035 a animales SZ redujo estos parámetros en un 64%, 69% y 88%, respectivamente (Fig. 1B, C y D). Además, los animales SZ no tratados mostraron un incremento significativo del contenido de IL-4 en el BAL, que no se redujo significativamente tras la administración del fármaco (Fig. 1E). Debido a que la actividad antiinflamatoria mostrada por TR14035 probablemente es consecuencia de la inhibición de la interacción de las integrinas α_4 con la VCAM-1 (*vascular cell adhesión molecule-1*), procedimos a evaluar con microscopia intravital el efecto de este fármaco en la microcirculación mesentérica de la rata. La IL-4 induce un aumento selectivo de la expresión de VCAM-1 en el endotelio, y también de la P-selectina mediante un mecanismo transcripcional.[25] La inyección intraperitoneal de IL-4 (0,2 µg/ml) causó un aumento significativo en la adhesión leucocitaria a las 24 horas de su administración (Fig. 1F). El tratamiento con TR14035 redujo esta respuesta a valores basales (Fig. 1F).

Efecto de distintos inhibidores de la PDE4 sobre la adhesión leucocitaria y la expresión de distintas MAC

En otro trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, llevamos a cabo una serie de

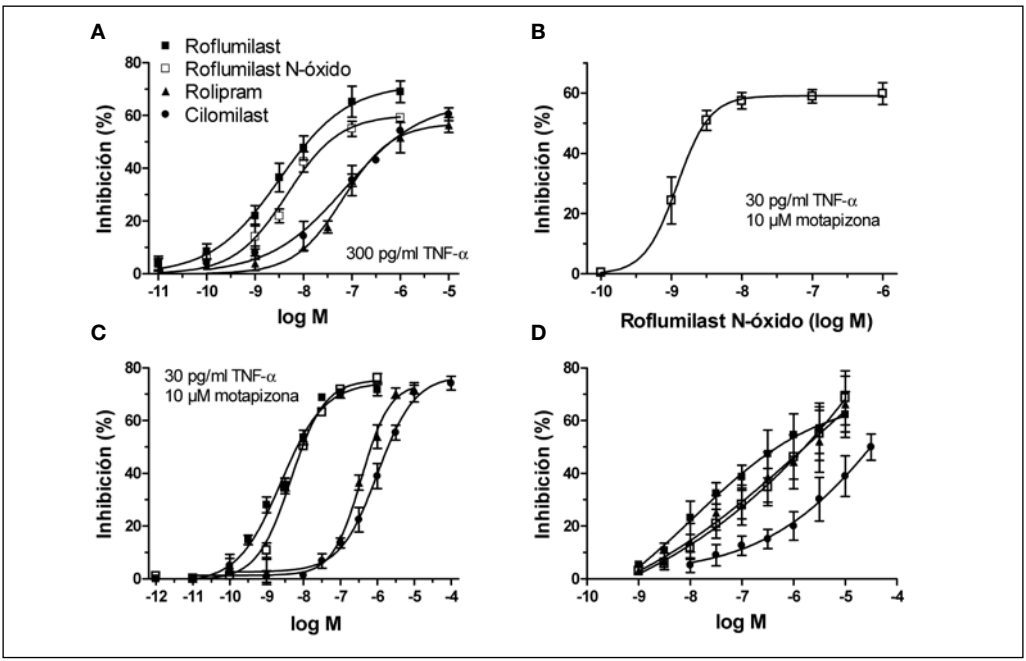


Figura 2. Efecto de distintos inhibidores de la PDE4 (roflumilast, roflumilast N-óxido, rolipram y cilomilast) sobre la adhesión de neutrófilos humanos a HUVEC estimuladas con TNF-α (A), aumento de RNAm de E-selectina (B) y E-selectina (C) en HUVEC estimuladas con TNF-α en presencia de un inhibidor de la PDE3 (motapizona), y sobre el aumento de la integrina CD11b en neutrófilos humanos estimulados con fMLP (D). Los resultados se presentan como media ± ESM, n = 4-6 muestras por grupo.

estudios *in vitro* con células humanas. En primer lugar comparamos la potencia de distintos inhibidores de la PDE4 en la adhesión de neutrófilos a HUVEC estimuladas con TNF-α (0,3 ng/ml) durante 3 horas. Como podemos observar en la Fig. 2A, todos los inhibidores de la PDE4 inhibieron, de forma dependiente de la concentración, la adhesión de neutrófilos a HUVEC estimuladas con TNF-α. El roflumilast N-óxido fue tan potente como el roflumilast, pero más potente que el rolipram y el cilomilast (Fig. 2A). Seguidamente procedimos a evaluar el efecto del roflumilast N-óxido sobre el aumento del RNAm de la E-selectina inducido por el TNF-α (30 pg/ml). Comprobamos que inhibía dicho aumento de forma dependiente de la concentración en presencia de un inhibidor de la PDE3 como la motapizona (10 μM) (Fig. 2B). Cuando se comparó el efecto de los cuatro inhibidores de la PDE4 sobre el aumento de la expresión de E-selectina en las HUVEC estimuladas con TNF-α, tanto el roflumilast como el roflumilast N-óxido fueron más potentes que el rolipram y el cilomilast (Fig. 2C). Finalmente, investigamos el efecto de estos fármacos sobre el aumento de la expresión de la integrina CD11b en neutrófilos humanos estimulados con fMLP en un protocolo con sangre entera. Al igual que en los casos anteriores, todos los inhibidores de la PDE4 probados inhibieron este parámetro de forma dependiente de la concentración, y todos resultaron equieficaces, ya que la máxima inhibición de esta respuesta osciló entre el 65% y el 75% (Fig. 2D). En este caso, el roflumilast, el roflumilast N-óxido y el rolipram mostraron una potencia similar, muy superior a la del cilomilast (Fig. 2D).

Discusión

Diversos estudios ya demostraron que la administración de anticuerpos neutralizantes de la integrina α_4 mejoraban diversos aspectos de la fase tardía de la respuesta alérgica de las vías aéreas, como la infiltración de células inflamatorias o la hiperreactividad bronquial,[26,27] haciendo de la interacción $\alpha_4\beta_1$/VCAM-1 una atractiva diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos antiasmáticos. En un primer estudio comprobamos que la administración oral del compuesto TR14035, antagonista de bajo peso molecular y dual de las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$, tanto en humanos como en roedores, mejoraba claramente los signos de disfunción pulmonar en un modelo experimental de asma alérgica. Los animales SZ expuestos al antígeno mostraron un persistente incremento de la hiperreactividad pulmonar a la 5-HT y de la acumulación de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos en el BAL a las 24 horas de la exposición al antígeno. La administración oral de TR14035 a estos animales suprimió la hiperreactividad pulmonar y el número de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos, así como la actividad EPO. Sin embrago, no afectó al incremento de la IL-4 en el BAL. Además, TR14035 no afectó a la hiperreactividad pulmonar basal, lo cual indica que no parece comportarse como un relajante de la musculatura lisa bronquial. Por otro lado, el hecho de que no se inhiba totalmente la infiltración eosinofílica puede explicarse por la existencia de relaciones entre otras MAC diferentes a la interacción $\alpha_4\beta_1$/VCAM-1, como la de las integrinas β_2 con la ICAM-1. Otro interesente hallazgo de este estudio fue la capacidad de TR14035 de disminuir el contenido de EPO en el BAL de los animales SZ, lo que sugiere que este compuesto también podría reducir la actividad eosinofílica. Por último, se empleó microscopia intravital para examinar el flujo leucocitario en la microcirculación mesentérica de la rata a las 24 horas de la administración de IL-4, ya que las interacciones leucocito-endotelio preceden a la acumulación de leucocitos que se puede detectar en el BAL. Aunque lo más correcto hubiese sido efectuar estos experimentos en la microcirculación pulmonar, esta técnica aún no ha podido ser desarrollada para la realización de este estudio, por lo que en su lugar se seleccionó el lecho mesentérico. Tampoco los modelos de exposición antigénica por inyección intraperitoneal son adecuados, ya que darían lugar a una reacción anafiláctica sistémica. A pesar de ello, hoy día se puede aplicar esta técnica

con este tipo de protocolo si se realiza la exposición antigénica localmente, en el cremáster del ratón sensibilizado. Debido a que el antagonista dual de las integrinas $\alpha_4\beta_1/\alpha_4\alpha_7$ careció de efecto sobre el aumento en el contenido de IL-4 en los animales SZ, y a que esta citocina provoca un aumento selectivo de la VCAM-1 en el endotelio,[25] comprobamos que la administración oral de TR14035 podía inhibir la adhesión y la migración leucocitaria inducida por IL-4. Los resultados de este trabajo sugieren claramente que el mecanismo adhesivo que involucra a las integrinas α_4 participa en las respuestas fisiopatológicas asociadas a la inflamación, la cual se desarrolla tras la exposición al antígeno en el modelo de asma alérgica en la rata Brown Norway.

En el segundo trabajo comprobamos, utilizando microscopia intravital, que la administración de un inhibidor de la PDE4 como el roflumilast inhibía de manera dependiente de la dosis las interacciones leucocito-endotelio a las cuatro horas de la administración de LPS y la extravasación plasmática inducida por histamina. Asimismo, observamos que el roflumilast inhibía *in vivo* el aumento de la expresión de las selectinas P y E inducido por LPS. Con el fin de poder extrapolar estos estudios a humanos y comparar su potencia con la de otros inhibidores de la PDE4, realizamos una serie de experimentos complementarios *in vitro* con HUVEC, neutrófilos y sangre entera. El principal metabolito de roflumilast, el roflumilast N-óxido, redujo la adhesión de neutrófilos a las HUVEC, el aumento de la expresión de CD11b en neutrófilos, la expresión endotelial de E-selectina y el aumento de la permeabilidad endotelial de forma dependiente de la concentración. Estos resultados sugieren que la inhibición de la adhesión de neutrófilos a HUVEC estimuladas durante tres horas con TNF-α parece deberse tanto a la disminución de la expresión endotelial de E-selectina como de integrinas β_2 en la superficie leucocitaria. La expresión de P-selectina en las HUVEC no se puede medir adecuadamente, ya que se pierde tras la realización del segundo pase y en el primero su expresión es errática. Por otro lado, en células endoteliales, la actividad hidrolítica del AMPc reside fundamentalmente en dos isoenzimas, PDE3 y PDE4, y por ello en ocasiones hay que inhibir ambas para observar el efecto sobre la función investigada. Ésta es la razón por la cual muchos de estos estudios *in vitro* se han llevado a cabo en presencia de motapizona, inhibidor selectivo de la PDE3, que por sí misma carece de efecto sobre la adhesión de los neutrófilos a las HUVEC estimuladas con TNF-α, pero aumenta la eficacia de los inhibidores de la PDE4. En general, el roflumilast N-óxido y el roflumilast han resultado más potentes que el rolipram y el cilomilast en la mayoría de los estudios realizados *in vitro*. Por consiguiente, el presente trabajo demuestra la capacidad de los inhibidores de la PDE4 para suprimir, tanto *in vivo* como *in vitro*, las interacciones leucocito-endotelio y la permeabilidad endotelial, procesos característicos de la respuesta inflamatoria crónica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. J Allergy Clin Immunol. 1990;85:422-36.
2. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. Annu Rev Immunol. 1999;17:255-81.
3. Welbourn CR, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. Br J Surg. 1992;79:998-1003.
4. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. Curr Opin Hematol. 2006;13:21-7.
5. O'Byrne PM, Postma DS. The many faces of airway inflammation. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Asthma Research Group. Am J Respir Crit Care Med. 1999;159: S41-63.
6. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. Cell. 1991;67:1033-6.
7. Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. Lancet. 1994;343:831-6.
8. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell. 1994;76:301-14.

9. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. Pharmacol Rev. 2000;52: 349-74.
10. Goldsmith AM, Hershenson MB, Wolbert MP, Bentley JK. Regulation of airway smooth muscle alpha-actin expression by glucocorticoids. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;292: L99-L106.
11. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev Immunol. 2007;7:678-89.
12. Wang HB, Wang JT, Zhang L, Geng ZH, Xu WL, Xu T, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. Nat Immunol. 2007;8:882-92.
13. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. Annu Rev Med. 2003;54:113-29.
14. Kips JC, Joos GF, Peleman RA, Pauwels RA. The effect of zardaverine, an inhibitor of phosphodiesterase isoenzymes III and IV, on endotoxin-induced airway changes in rats. Clin Exp Allergy. 1993;23:518-23.
15. Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K. Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. Lancet. 1999;353:1819-23.
16. Gamble E, Grootendorst DC, Brightling CE, Troy S, Qiu Y, Zhu J, et al. Antiinflammatory effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor cilomilast (Ariflo) in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168:976-82.
17. Sanz MJ, Álvarez A, Piqueras L, Cerdà M, Issekutz AC, Lobb RR, et al. Rolipram inhibits leukocyte-endothelial cell interactions in vivo through P- and E-selectin downregulation. Br J Pharmacol. 2002;135:1872-81.
18. Cortijo J, Sanz MJ, Iranzo A, Montesinos JL, Nabah YN, Alfón J, et al. A small molecule, orally active, alpha4beta1/alpha4beta7 dual antagonist reduces leukocyte infiltration and airway hyper-responsiveness in an experimental model of allergic asthma in Brown Norway rats. Br J Pharmacol. 2006;147:661-70.
19. Sanz MJ, Nabah YN, Cerdá-Nicolás M, O'Connor JE, Issekutz AC, Cortijo J, et al. Erythromycin exerts in vivo anti-inflammatory activity downregulating cell adhesion molecule expression. Br J Pharmacol. 2005;144:190-201.
20. Sanz MJ, Cortijo J, Taha MA, Cerdá-Nicolás M, Schatkon E, Burgbacher B, et al. Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability. Br J Pharmacol. 2007;152:481-92.
21. Sanz MJ, Hickey MJ, Johnston B, McCofferty DM, Raharjo E, Huang PL et al. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. Br J Pharmacol. 2001;134:305-12.
22. Martínez-Losa M, Cortijo J, Juan G, O'Connor JE, Sanz MJ, Santangelo F, et al. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on functional responses of human eosinophils in vitro. Clin Exp Allergy. 2007;37:714-22.
23. Mateo T, Naim Abu Nabah Y, Losada M, Estellés R, Company C, Bedrina B, et al. A critical role for TNFalpha in the selective attachment of mononuclear leukocytes to angiotensin-II-stimulated arterioles. Blood. 2007;110:1895-902.
24. Sanz MJ, Hartnell A, Chisholm P, Williams C, Davies D, Weg VB, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced eosinophil accumulation in rat skin is dependent on alpha4 integrin/vascular cell adhesion molecule-1 adhesion pathways. Blood. 1997;90:4144-52.
25. Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. J Exp Med. 1996;184:81-92.
26. Abraham WM, Ahmed A, Sielczak MW, Narita M, Arrhenius T, Elices MJ. Blockade of late-phase airway responses and airway hyperresponsiveness in allergic sheep with a small-molecule peptide inhibitor of VLA-4. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156:696-703.
27. Kudlacz E, Whitney C, Andresen C, Duplantier A, Beckius G, Chupak L, et al. Pulmonary eosinophilia in a murine model of allergic inflammation is attenuated by small molecule alpha4beta1 antagonists. J Pharmacol Exp Ther. 2002;301:747-52.

DISCUSIÓN

A. Badia: ¿Qué posible alternativa terapéutica tendría una mayor aplicabilidad para personas con afecciones pulmonares?

M.J. Sanz: Para el tratamiento del asma y la EPOC, el roflumilast, un inhibidor de la fosfodiesterasa-4 que ya está en fase III.

A.M. Planas: Has mencionado que la IL-4 provoca un aumento de VCAM-1; en cambio, yo asociaba la IL-4 con la respuesta inflamatoria Th2.

M.J. Sanz: En una inflamación neutrofílica, la IL-4 es antiinflamatoria y equivalente a la IL-10. En una inflamación de tipo alérgico es proinflamatoria, de modo que atrae eosinófilos y mononucleares.

A.M. Planas: Al contrario de lo que sucede en el cerebro, en el caso que has expuesto los eosinófilos desempeñan un papel relevante y supongo que provocan alguna respuesta en la infiltración de las demás células. ¿Es así?

M.J. Sanz: No. En el asma, los primeros que acuden son los neutrófilos. A diferencia de lo que ocurre en el cerebro, los siguientes son los linfocitos Th2, los cuales liberan IL-4 y IL-5, promoviendo la movilización de eosinófilos desde la médula ósea hasta los pulmones. Finalmente, los leucotrienos, las proteínas catiónicas, entre otros, al ser liberados de los eosinófilos, producen daño en las vías aéreas y broncoconstricción.

A.M. Planas: ¿El endotelio puede responder de forma distinta en función del órgano?

M.J. Sanz: Sí, en las interacciones leucocito-endotelio por angiotensina II se acumulan neutrófilos en el endotelio venular, mientras que en el arteriolar sólo se han observado mononucleares. En el caso del *trans*-resveratrol, a dosis bajas inhibe la infiltración leucocitaria venular, pero no sucede lo mismo en las arteriolas. Es necesario aumentar la dosis para conseguir efectos antiaterógenos. Incluso se han observado diferencias en las quimiocinas, de modo que a dosis altas se inhiben también aquellas quimiocinas que afectan a la quimiotaxis de los leucocitos mononucleares.

A.M. Planas: Es un tema muy interesante, porque cuando hay una dosis establecida tendemos a utilizarla para otras aplicaciones, y creo que deberíamos revisarlo.

Papel de los canales de potasio dependientes del voltaje, de la PKCζ y de las especies reactivas de oxígeno en la vasoconstricción pulmonar inducida por tromboxano A_2. Estudios funcionales frente a técnicas complementarias

F. Pérez-Vizcaíno, A. Cogolludo y L. Moreno
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Resumen: *Los canales de potasio dependientes del voltaje (K_v) desempeñan un importante papel en la contracción del músculo liso vascular pulmonar y en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar. Nuestros trabajos recientes, empleando experimentos funcionales, antagonistas de los receptores e inhibidores selectivos de distintas vías de señalización, y diversas técnicas complementarias que incluyen la medida del calcio intracelular, el análisis de corrientes iónicas, la medida de segundos mensajeros y análisis de expresión, fosforilación y asociación de proteínas, indican que los vasoconstrictores implicados en la hipertensión pulmonar inducen una respuesta contráctil mediada por los canales K_v. En particular, el tromboxano A_2 (TXA_2) produce una respuesta contráctil en las arterias pulmonares cuyo mecanismo de señalización implica la activación y la translocación de una isoforma de la proteína cinasa C (PKC) atípica, la PKCζ, hacia la membrana, y la producción de especies reactivas de oxígeno por la NADPH oxidasa de la membrana y el bloqueo de los canales K_v. La proteína adaptadora p62 también está implicada en la asociación entre la PKCζ y los canales $K_v1.5$. Estos mecanismos de señalización pueden variar en función de la especie animal y de la edad. Tales resultados permiten establecer por primera vez una conexión entre dos mecanismos fisiopatológicos fundamentales en la hipertensión pulmonar, como son los canales K_v y la activación de los receptores del tromboxano (TP) por el TXA_2 y los isoprostanos.*

Palabras clave: Canales de K^+ – Tromboxano A_2 – Proteína cinasa C – Hipertensión pulmonar.

Papel de los canales de potasio dependientes del voltaje en el control del tono pulmonar

Los canales de K^+ desempeñan un importante papel en el control del potencial de membrana, de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) y de la contracción del músculo liso vascular.[1] Así, la activación de los canales de K^+ produce hiperpolarización de la membrana, mientras que su inhibición la despolariza, produciendo la activación de los canales de Ca^{2+}

dependientes del voltaje de tipo L, aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y vasoconstricción. En células musculares lisas de arteria pulmonar se han identificado distintos tipos de canales de K^+: dependientes del voltaje (K_V), activados por Ca^{2+} de alta conductancia (BK_{Ca}) y dependientes de ATP (K_{ATP}).[1] De ellos, en los últimos años los K_V vienen suscitando un creciente interés en la circulación pulmonar debido a diversas razones. En primer lugar, estos canales determinan el potencial de membrana en las células musculares lisas de arteria pulmonar. Asimismo, son modulados negativamente por mediadores vasoactivos implicados en la hipertensión pulmonar, como la endotelina-1 (ET-1), la angiotensina II (ATII) y el tromboxano A_2 (TXA_2), y por la hipoxia.[2-4] Por último, la reducción tanto de la expresión como de la función de estos canales se ha implicado en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar primaria y de la inducida por fármacos anorexígenos.

Vasoconstricción inducida por TXA_2 y papel en la hipertensión pulmonar

El TXA_2 es un metabolito del ácido araquidónico producido por la actividad secuencial de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y de la tromboxano sintetasa. El TXA_2 activa los receptores del tromboxano (TP) e induce agregación plaquetaria, vasoconstricción e hipertrofia/hiperplasia del músculo liso vascular, así como un estado protrombótico en la superficie endotelial. Dichos receptores se activan también por diversos isoprostanos, principalmente el 8-isoPGF$_{2\alpha}$, que se generan a partir de la peroxidación del ácido araquidónico de la membrana celular mediada por radicales libres de oxígeno. Se han descrito concentraciones elevadas locales y sistémicas de TXA_2 y de isoprostanos en diversas enfermedades vasculares.[5] Sus acciones vasoconstrictoras son especialmente pronunciadas en el territorio pulmonar, donde participa en el control del tono vascular en situaciones fisiológicas y, especialmente, patológicas. De hecho, el TXA_2 se ha implicado en diversas formas de hipertensión pulmonar primaria y secundaria.[6]

Vasoconstricción pulmonar inducida por TXA_2 y papel de los canales K_V

Empleando arterias pulmonares aisladas de rata montadas en un baño de órganos observamos que la vasoconstricción inducida por U46619, un análogo de TXA_2, se inhibía con el antagonista del Ca^{2+} nifedipino y con el antagonista de receptores TP SQ29548.[2] Estos sencillos experimentos funcionales nos indicaban que el efecto estaba mediado por receptores TP y que implicaba la activación de canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje de tipo L. Para corroborar este mecanismo estudiamos las concentraciones de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) de manera simultánea a la respuesta contráctil cargando las arterias con Fura-2 y analizando la fluorescencia emitida por este fluoróforo. Efectivamente, encontramos una correlación entre el aumento de ($[Ca^{2+}]_i$) y la contracción, y que ambos se inhibían con nifedipino.[2] En un estudio posterior realizado en arterias pulmonares de lechón encontramos que el U46619 también estimulaba el aumento de $[Ca^{2+}]_i$, y que éste también se inhibía con nifedipino.[7] En principio, estos datos indicarían que también la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de tipo L sería fundamental para la contracción de las arterias pulmonares de lechón. Sin embargo, a pesar de reducir marcadamente el $[Ca^{2+}]_i$, el nifedipino apenas afectaba a la respuesta contráctil. Por tanto, entraban en contradicción los estudios funcionales con los del análisis del Ca^{2+}. Los datos nos indicaban que, a pesar de que se produce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en las arterias pulmonares de lechón, este aumento no es esencial para la respuesta contráctil. Por el contrario, los inhibidores de la Rho cinasa relajaban la contracción inducida por U46619 sin apenas cambios en el $[Ca^{2+}]_i$, lo cual indica que los mecanismos de sensibilización al $[Ca^{2+}]_i$ mediante la Rho cinasa son más importantes en esta especie.

Volviendo a las arterias pulmonares de rata, donde los canales L sí son importantes, analizamos el efecto del U46619 sobre la entrada de Ca^{2+} empleando la técnica del parche de membrana, el patrón oro en los es-

tudios de canales iónicos. De nuevo encontramos una clara discordancia entre los estudios funcionales y el estudio electrofisiológico: el U46619 no aumenta las corrientes de Ca^{2+}.[2] Nos enfrentamos, por tanto, a la disyuntiva de "creernos" los estudios funcionales o los electrofisiológicos. Sin embargo, la explicación era sencilla. Con la técnica del parche de membrana controlamos el potencial de membrana y así estamos eliminando un factor fundamental que regula la actividad de los canales L, ya que son dependientes del voltaje. Al analizar qué ocurría con el potencial de membrana, observamos que el análogo del TXA_2 inducía una despolarización de la membrana y, por tanto, este mecanismo nos explica por qué se activan los canales L.

En otro experimento funcional pretratamos las arterias pulmonares con KCl, produciendo una despolarización de la membrana y una vasoconstricción debida a la disminución de la actividad de los canales de K^+. En estas condiciones, el U46619 apenas era capaz de aumentar el $[Ca^{2+}]_i$ ni la contracción. Esto era una evidencia indirecta que apuntaba que el U46619 podría estar despolarizando la membrana mediante la inhibición de los canales de K^+. Para corroborarlo empleamos de nuevo la técnica del parche de membrana, y en esta ocasión sí observamos que el U46619 tenía un efecto inhibitorio sobre las corrientes de potasio dependientes del voltaje, acorde con la despolarización observada y con los estudios funcionales.

Vasoconstricción pulmonar inducida por TXA_2 y proteínas cinasas

Para analizar las posibles vías de señalización, y en particular el papel de las proteínas cinasas, recurrimos de nuevo a las arterias pulmonares montadas en un baño de órganos. Los inhibidores de la tirosina cinasa genisteína o de la Rho cinasa Y27632 no modificaron la respuesta contráctil al U46619, pero sí lo hicieron los inhibidores de la proteína cinasa C estaurosporina y calfostina. La proteína cinasa C es en realidad una familia de cinasas que comprende 11 isoformas distintas, que se agrupan en tres subfamilias: clásicas (cPKC), nuevas (nPKC) y atípicas (aPKC). Empleando inhibidores con selectividad parcial por algunas isoformas encontramos que el Gö6983 inhibía la respuesta, mientras que el Gö6976 y la bisindolilmaleimida no tenían efecto. Las únicas isoformas sensibles al Gö6983 e insensibles al Gö6976 y la bisindolilmaleimida eran las aPKC, que incluyen la PKCζ y la PKCλ/ι. Pudimos confirmar el papel de las aPKC mediante el efecto inhibitorio de un péptido pseudosustrato que inhibe de manera selectiva a las aPKC. Además, mediante Western blot confirmamos la presencia de la PKCζ, mientras que la PKCλ/ι no se expresaba en las arterias pulmonares de rata.[2] La activación de los receptores TP inducía también la translocación de la PKCζ hacia la membrana.[2] Estos resultados permiten establecer por primera vez una conexión entre dos mecanismos fisiopatológicos fundamentales en la hipertensión pulmonar, como son los canales K_V y la activación de los receptores TP por el TXA_2 y los isoprostanos.

Más recientemente, con el fin de verificar nuestros hallazgos anteriores, hemos llevado a cabo experimentos en ratones deficientes para el gen de la PKCζ ($PKC\zeta^{(-/-)}$).[8] En las arterias pulmonares de ratones con fenotipo salvaje, al igual que en las de las ratas, el U46619 producía una inhibición de los canales K_V, despolarización, aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y vasoconstricción. Por el contrario, en los ratones $PKC\zeta^{(-/-)}$ el U46619 no inhibía los canales K_V ni la despolarización, y el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y la vasoconstricción estaban marcadamente reducidos; exactamente los mismos resultados que habíamos observado empleando el péptido inhibidor específico de la PKCζ. Por lo tanto, los ratones modificados genéticamente confirmaban nuestros hallazgos farmacológicos previos.

Vasoconstricción pulmonar inducida por TXA_2 y proteínas adaptadoras

La PKCζ es una cinasa que tiene una pobre especificidad por el sustrato y es capaz

de fosforilar, en sistemas acelulares, un gran número de proteínas. La especificidad por el sustrato se logra mediante la localización subcelular y la participación de proteínas adaptadoras, como la p62, que actúan a manera de andamios (*scaffold*), uniéndose simultáneamente a dos o más proteínas y facilitando su interacción. Para analizar el papel de la p62 empleamos de nuevo ratones genéticamente deficientes en esta proteína.[8] Los estudios electrofisiológicos y el análisis del $[Ca^{2+}]_i$ nos indicaban que la p62 era esencial para la respuesta al análogo del TXA_2. Por el contrario, la respuesta contráctil era muy similar en ambos casos. Así, de nuevo se nos planteaba una discordancia entre el estudio funcional y los estudios complementarios del $[Ca^{2+}]_i$ y las corrientes iónicas. Como no disponemos de fármacos que inhiban la p62, la cuestión de si esta proteína es importante para la contracción del U46619 queda pendiente de resolver. Sin embargo, puesto que la contracción del U46619 es dependiente del Ca^{2+} en ratas y ratones con fenotipo salvaje, pero independiente en los ratones deficientes para el gen de la p62, creemos que esta deficiencia genética produce un cambio en la programación genética, de manera que la ausencia de p62 se compensa por una regulación al alza de mecanismos de señalización que implican

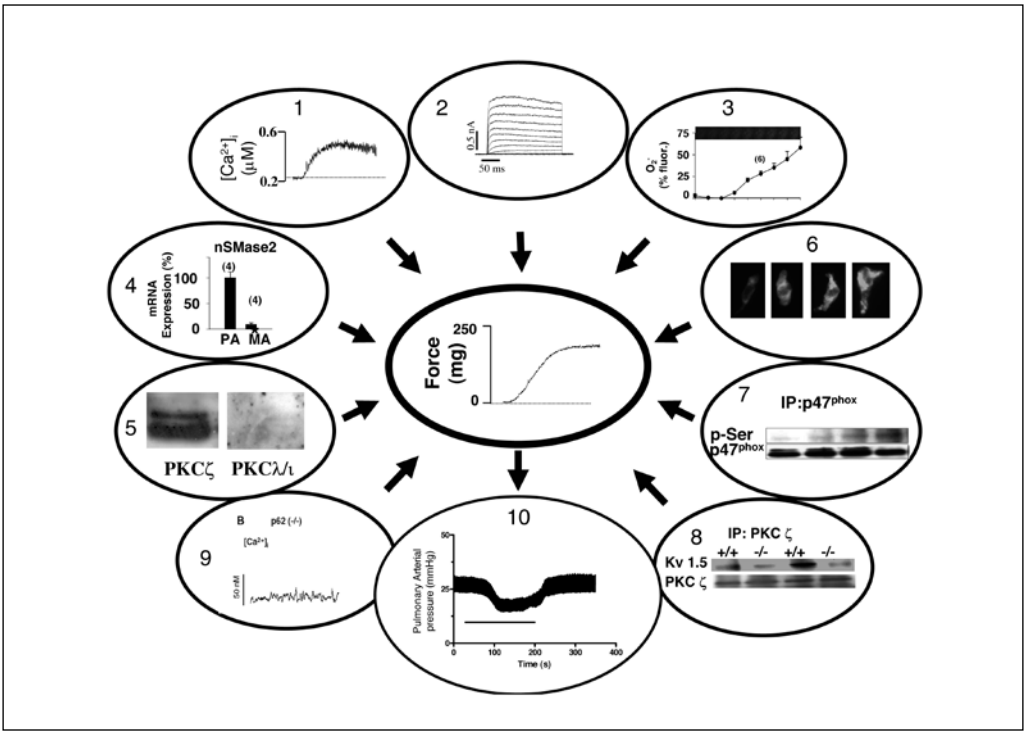


Figura 1. Los estudios funcionales que emplean las técnicas clásicas de contractilidad de arterias aisladas montadas en baño de órganos desempeñan un papel clave en el análisis de las vías de señalización. La medida del Ca^{2+} intracelular (1), las corrientes iónicas (2), la detección de los mensajeros intracelulares mediante fluorescencia (3), la expresión de genes en cuanto a RNAm (4) o proteína (5), la localización de proteínas o segundos mensajeros mediante inmunocitoquímica (6), los estudios de inmunoprecipitación para el estudio de la fosforilación (7) y la interacción de proteínas (8), y la utilización de sistemas de sobrexpresión o deleción genética (9), son herramientas complementarias y deben servir para explicar o corroborar los hallazgos de los estudios funcionales. Finalmente, los estudios in vitro *deben ser confirmados en estudios* in vivo *(10).*

sensibilización a las proteínas contráctiles, de modo similar a lo que habíamos observado en los lechones.

Vasoconstricción pulmonar inducida por TXA_2 y especies reactivas de oxígeno

Para analizar el posible papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) estudiamos el efecto de la catalasa en su forma permeable a la membrana, la polietilenglicol-catalasa (PEG-catalasa), sobre la contracción con U46619 en arterias pulmonares aisladas.[9] La PEG-catalasa inhibía la respuesta al U46619. De la misma manera, la apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa de membrana, la principal fuente vascular de ROS, también disminuía la respuesta contráctil y la inhibición de las corrientes K_V inducida por el U46619, lo que indica un papel clave de las ROS derivadas de este complejo enzimático.[9] Para confirmarlo medimos la producción de ROS mediante la fluorescencia de la diclorofluoresceína, y observamos un aumento con el U46619 que se inhibía por la PEG-catalasa y por la apocinina. El análogo de H_2O_2, t-butilhidroperóxido, reproducía el efecto contráctil del U46619. Sin embargo, esta contracción, al contrario que la del U46619, no se inhibía con el péptido inhibidor de la PKCζ. Esto nos sugería que la producción de ROS estaba localizada más abajo de la PKCζ en la cascada de señalización. La inhibición de la producción de ROS por el péptido inhibidor de la PKCζ nos confirmaba esta hipótesis.

Conclusiones

La activación de los receptores TP por el análogo de TXA_2 U46619 produce una inhibición de los canales K_V, lo que conduce a la despolarización de la membrana, la activación de los canales de Ca^{2+} de tipo L, el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y la vasoconstricción pulmonar.[2] El mecanismo de señalización implica la activación y la translocación de una isoforma de la proteína cinasa C (PKC) atípica, la PKCζ, hacia la membrana[2] y la producción de ROS por la NADPH oxidasa de la membrana.[7] Los mecanismos de señalización varían en función de la especie y de la edad.[5] En el lechón, la vía PKCζ-K_v-Ca^{2+} es la más importante en el recién nacido, mientras que tras los primeros días de vida aumenta la participación de la sensibilización al calcio mediante la Rho cinasa.

Para el estudio de los mecanismos de señalización, nuestro *modus operandi* es analizar siempre los efectos sobre la función empleando herramientas farmacológicas. Cualquier efecto o mecanismo que se observe en experimentos funcionales tiene una alta probabilidad de tener relevancia fisiológica, farmacológica o fisiopatológica. Los experimentos funcionales son económicos y tremendamente versátiles. Una limitación importante de estos estudios es la disponibilidad de herramientas farmacológicas lo suficientemente específicas. En nuestro laboratorio disponemos de una serie de técnicas complementarias que son de gran ayuda para corroborar, explicar o realzar los datos obtenidos en estudios funcionales (Fig. 1). Empleando un símil cinematográfico, los estudios funcionales deben ser el argumento de un trabajo y las técnicas complementarias los efectos especiales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Golovina VA, Rubin LJ. Molecular basis and function of voltage-gated K^+ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. Am J Physiol. 1998;274: L621-35.
2. Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F. Thromboxane A2-induced inhibition of voltage-gated K^+ channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase Czeta. Circ Res. 2003;93:656-63.
3. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeño L, Tamargo J, et al. Serotonin inhibits voltage-gated K^+ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT2A receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. Circ Res. 2006;98:931-8.
4. Cogolludo A, Moreno L, Villamor E. Mechanisms controlling vascular tone in pulmonary

arterial hypertension: implications for vasodilator therapy. Pharmacology. 2007;79:65-75.
5. Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001;280: L1067-82.
6. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1992;327:70-5.
7. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F. Postnatal maturational shift from PKCzeta and voltage-gated K^+ channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. Cardiovasc Res. 2005;66:84-93.
8. Moreno L, Frazziano G, Cogolludo A, Cobeño L, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F. Role of protein kinase C zeta and its adaptor protein p62 in voltage-gated potassium channel modulation in pulmonary arteries. Mol Pharmacol. 2007;72:1301-9.
9. Cogolludo A, Frazziano G, Cobeño L, Moreno L, Lodi F, Villamor E, et al. Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries. Ann NY Acad Sci. 2006;1091:41-51.

DISCUSIÓN

P. D'Ocón: Quería comentar unos resultados que encontramos analizando *in vitro* la respuesta vascular a la hipoxia en arteria pulmonar. Observamos una respuesta trifásica que, en función de la magnitud de las fases, conseguía un tono final resultante más alto en la arteria pulmonar que en la mesentérica, pero que cualitativamente era muy similar en ambos vasos.

F. Pérez-Vizcaíno: A veces la vasoconstricción observada no refleja bien la verdadera vasoconstricción pulmonar hipóxica *in vivo*. Para ello es necesario trabajar con las arterias de pequeño calibre, montarlas en un miógrafo, no utilizar pretono (sin un vasoconstrictor previo) y darles la tensión óptima, que es la equivalente a 15-20 mmHg (tensión de las arterias pulmonares en estado fisiológico).

P. D'Ocón: ¿No crees que en la hipoxia, en condiciones fisiológicas, los vasos ya tienen un tono previo? Nosotros hemos probado con un tono inducido por fenilefrina en arteria pulmonar y hemos observado que responde a la hipoxia a concentraciones de oxígeno más bajas que la mesentérica. Sin embargo, cuando no utilizábamos un tono previo no había respuesta.

F. Pérez-Vizcaíno: Las arterias pulmonares principales se consideran insensibles a la hipoxia, porque al ser su aporte principal al pulmón, si respondieran a la hipoxia cerrarían el flujo a todo el pulmón. El mecanismo trata de redistribuir el flujo hacia el resto del pulmón que no está afectado por la hipoxia. En segundo lugar, el alvéolo está muy lejos de la arteria pulmonar, al contrario que las arterias de pequeño calibre, que son las que en realidad distribuyen el oxígeno.

J.M. Baeyens: ¿Existen muchos estimuladores de los canales de potasio dependientes del voltaje?

F. Pérez-Vizcaíno: Ése es un problema fundamental, porque no disponemos de fármacos agonistas específicos de estos canales.

J. Llenas: ¿Crees que el modelo de la monocrotalina es todavía un modelo válido para evaluar agentes que actúen sobre la hipertensión pulmonar?

F. Pérez-Vizcaíno: Sí, es un modelo ampliamente utilizado por su sencillez y además está muy estandarizado, pero hay muchos otros modelos.

J. Sallés: ¿A qué concentraciones la desipramina actúa como inhibidor de las esfingomielinasas en la cascada de activación de la PKCζ? ¿Es una propiedad específica o también la poseen otros tricíclicos?

F. Pérez-Vizcaíno: La farmacología de las esfingomielinasas está aún poco descrita. Como inhibidores de la esfingomielinasa ácida se utilizan el D609 y la desipramina. En cuanto a si otros tricíclicos también tienen esta acción, es fácil pensar que la imipramina actúe como inhibidor por su analogía con la desipramina.

J.M. Vela: ¿Nos podrías dar unas pinceladas sobre el papel de la serotonina y de los receptores implicados?

F. Pérez-Vizcaíno: La serotonina es un mediador implicado en la hipertensión pulmonar, y la vasoconstricción que produce está relacionada con el bloqueo de los canales K_v e implica a los receptores 5-HT2A, que se bloquean con ketanserina y su señalización es clásica: fosfolipasa C, diacilglicerol y PKC. En otros estudios observamos que la fluoxetina bloqueaba la respuesta de la serotonina y, en cambio, la fluvoxamina y el citalopram no tenía ningún efecto. Luego, en la literatura, encontramos que la fluoxetina tiene bastante afinidad por los receptores 5-HT2A. Además, se ha propuesto que la fluoxetina podría ser un tratamiento de la hipertensión pulmonar por su papel en la recaptación de serotonina.

Estudios funcionales en aprendizaje y memoria

M.J. Ramírez
Departamento de Farmacología, Universidad de Navarra, Pamplona.

Resumen: *En este trabajo se describen algunos de los experimentos realizados en nuestro laboratorio con dos de los paradigmas conductuales más utilizados a día de hoy para valorar el aprendizaje y la memoria en el animal de experimentación: el laberinto acuático de Morris y la prueba de reconocimiento de nuevo objeto. Se intentará llevar a cabo una valoración crítica de su utilidad, y se comentarán los diversos factores que hay que tener en cuenta a la hora de escoger un modelo concreto. Así, en modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer, en los cuales se imita la hipofunción colinérgica característica, bien mediante antagonistas muscarínicos, como la escopolamina, o mediante la producción de una lesión selectiva colinérgica, se observa un déficit cognitivo en la prueba del laberinto acuático de Morris. En modelos experimentales de depresión (separación materna) se pueden observar, en la prueba de reconocimiento de nuevo objeto, déficit cognitivos asociados. Los estudios funcionales de aprendizaje y memoria que describimos pueden utilizarse para evaluar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de los déficit cognitivos característicos o asociados a diversas enfermedades neuropsiquiátricas.*

Palabras clave: Laberinto acuático de Morris – Reconocimiento de nuevo objeto – Enfermedad de Alzheimer – Escopolamina – Lesión selectiva colinérgica – Depresión – Separación materna – Mifepristona.

Introducción

Una de las características más importantes del ser humano es su capacidad de aprender y recordar. El aprendizaje es el proceso por el cual adquirimos conocimientos sobre el mundo. La memoria es la retención o almacenamiento de esos conocimientos.

Hay enfermedades, como las demencias, caracterizadas por el deterioro cognitivo. En otras ocasiones, como en la depresión, los problemas de aprendizaje y memoria, aunque no son el signo característico de la enfermedad, la acompañan. En cualquier caso, son necesarios modelos animales que permitan el estudio de los mecanismos etiopatogénicos que subyacen a los déficit cognitivos, y de sus posibles tratamientos farmacológicos.

En este trabajo se describen algunos de los experimentos realizados en nuestro laboratorio utilizando dos de las pruebas que actualmente más se usan para valorar el aprendizaje y la memoria en el animal de experimentación: el laberinto acuático de Morris y la prueba de reconocimiento de nuevo objeto. Se intentará llevar a cabo una valoración crítica de su utilidad, y comentaremos los factores que hay que tener en cuenta a la hora de escoger un modelo concreto. El caso de los antagonistas de los receptores 5-HT_6 es un ejemplo reciente

de cómo la elección del paradigma funcional, e incluso del protocolo utilizado, lleva a importantes diferencias en los resultados. Así, la administración de Ro 04-6790, un antagonista 5-HT_6, mejora la retención en la prueba del laberinto acuático de Morris[1] y revierte el déficit cognitivo inducido por escopolamina en el *autoshaping task*.[2] Otros dos antagonistas 5-HT_6, SB-399885 y SB-271046, han mostrado su capacidad de mejorar el reconocimiento de objetos[3-5] y la retención en el laberinto acuático de Morris.[6] Sin embargo, estos compuestos fueron incapaces de alterar la adquisición en esta misma prueba. En la prueba de la evitación pasiva, SB-271046 revirtió los déficit cognitivos inducidos por escopolamina.[7] Por el contrario, Russell y Dias[8] y Lindner y cols.[9] no pudieron conseguir que Ro 04-6790 y SB-271046 tuvieran un efecto favorable sobre la memoria en el *autoshaping task* ni en la retención en el laberinto acuático de Morris. Pérez-García y Meneses[10] hicieron una interesante discusión sobre la fiabilidad de estos datos, señalando que diferencias metodológicas y en la elección de la prueba funcional podrían contribuir a esos resultados contradictorios.

Demencias: enfermedad de Alzheimer

En estos momentos, la enfermedad de Alzheimer supone la demencia primaria neurodegenerativa mas frecuente. Comienza con una pérdida de memoria reciente, originada por un déficit para la formación de nuevos recuerdos, ocasionado por la precoz afectación del córtex entorrinal y el hipocampo, que origina un síndrome de desconexión entre las entradas sensoriales y los circuitos mnésicos cortico-subcorticales. En la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer se han implicado diversas alteraciones histopatológicas, entre las que cabe destacar una marcada atrofia de la corteza cerebral, con pérdida de neuronas corticales y subcorticales, la formación de las denominadas "placas seniles", consistentes en acumulaciones de proteína beta-amiloide (Aβ) con degeneraciones neuríticas, y ovillos neurofibrilares, compuestos de pares de filamentos helicoidales de proteína tau (τ) hiperfosforilada.[11] El deterioro cognitivo de los pacientes con Alzheimer presenta una correlación directa con la presencia y el número de estas formaciones, que son particularmente notables en el hipocampo y en zonas asociativas de la corteza cerebral.

El resultado final de muerte neuronal y pérdida de sinapsis es una serie de alteraciones neuroquímicas. En 1982 se planteó la "hipótesis colinérgica" para explicar la patogenia del Alzheimer.[12] Proponía que los déficit cognitivos de la enfermedad estaban causados por la disminución de la síntesis de acetilcolina y que, en consecuencia, si se aumentaba la concentración intrasináptica de este neurotransmisor se produciría una mejoría de estos enfermos. Hasta ahora, la única estrategia farmacoterapéutica (además de la memantina) que ha demostrado cierta eficacia para mejorar, siquiera sintomáticamente, al paciente que sufre enfermedad de Alzheimer, es la encaminada a evitar la degradación de la acetilcolina. Así, por ejemplo, los fármacos que inhiben de forma reversible la acetilcolinesterasa cerebral, como el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina, evitan la degradación del neurotransmisor, y de esta manera favorecen la elevación de las concentraciones de acetilcolina en la hendidura sináptica, facilitando los efectos del neurotransmisor.

De esta forma, los modelos animales de enfermedad de Alzheimer se han centrado tradicionalmente en imitar esa hipofunción colinérgica, y de hecho se ha considerado, exponiéndolo de forma simplificada, que cualquier fármaco capaz de aumentar la liberación de acetilcolina es un posible candidato para el tratamiento de la enfermedad. Para conseguir una hipofunción colinérgica se utilizan fundamentalmente dos métodos: la administración de antagonistas muscarínicos, como la escopolamina, y la producción de lesiones selectivas colinérgicas.

Laberinto acuático de Morris

El hombre puede reconocer estímulos que ha visto antes, realizar asociaciones entre ellos

e incluso orientarse de acuerdo con las relaciones que establece entre los estímulos. La mayoría de los animales también se orientan en el espacio para organizar sus conductas en relación con el entorno en que se encuentran en cada momento. El aprendizaje y la memoria espacial se relacionan con la capacidad de adquirir y retener asociaciones de las características del ambiente, lo que permite al organismo desenvolverse en el espacio. Esta memoria puede ser evaluada mediante modelos animales en que la solución de la tarea depende de la información espacial disponible. El laberinto acuático es uno de los modelos más empleados en el estudio de la memoria espacial en roedores. En este laberinto, diseñado por Morris en 1984,[13] los animales tienen que nadar para localizar una plataforma oculta siguiendo una serie de estímulos visuales externos con los que se orienta para conocer su posición exacta.

Este paradigma resulta de especial interés, puesto que no necesita de la privación de agua o comida ni de la aplicación de una descarga eléctrica para motivar la conducta. Existe amplia evidencia del importante papel que desempeña el hipocampo en la memoria declarativa en los humanos y en la espacial en los roedores. Por lo tanto, dada la afectación del hipocampo y de la memoria visuoespacial en la enfermedad de Alzheimer, esta prueba del laberinto acuático de Morris resulta de especial utilidad.

Déficit cognitivos inducidos por escopolamina

Puesto que la idea del déficit colinérgico en la enfermedad de Alzheimer es ampliamente aceptada, incluyendo que la activación de los receptores muscarínicos es necesaria para la formación de la memoria, los antagonistas colinérgicos muscarínicos, principalmente la escopolamina, se utilizan para reproducir alteraciones de la memoria y para el desarrollo de nuevos fármacos útiles en el tratamiento de la enfermedad.

En el laberinto acuático de Morris, la escopolamina (0,2-0,6 mg/kg) provoca un déficit cognitivo que se manifiesta por una incapacidad para encontrar la plataforma oculta, y con frecuencia, dependiendo de la dosis utilizada, por una natación tigmotáxica alrededor de la piscina.

Experimento

El tratamiento combinado con ondansetrón (antagonista de los receptores 5-HT_3) y flumazenilo (antagonista de los receptores $GABA_A$ por el lugar de fijación de las benzodiacepinas) revierte los déficit cognitivos inducidos por la escopolamina en el laberinto acuático de Morris.[14]

Basándonos en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación,[15] en el cual demostramos que el tratamiento combinado con ondansetrón y flumazenilo producía una liberación de acetilcolina *in vivo* significativamente superior a la de los fármacos por separado, nos propusimos estudiar si este aumento en la liberación de acetilcolina se reflejaba funcionalmente en una prueba cognitiva.

Equipo y protocolo utilizado

El laberinto consistía en una piscina circular negra (145 cm diámetro × 55 cm altura), llena de agua a 22 °C. Una plataforma negra invisible, situada por debajo del nivel del agua, se mantenía en una posición fija en el cuadrante designado como C. La piscina estaba rodeada de figuras geométricas negras, que servían de pistas visuales externas.

El protocolo consistió en un primer día de habituación, en el cual las ratas llevaron a cabo un único pase, durante 60 segundos, sin la plataforma. En la fase de adquisición (días 2 y 3), las ratas llevaron a cabo seis pases por día (de 120 segundos) con la plataforma de escape en una posición fija. Se permitió nadar a las ratas libremente hasta encontrar la plataforma o hasta que pasaban los 120 segundos. Los resultados se expresaron como el tiempo de latencia para encontrar la plataforma. Los días 4 y 7 (días de retención, memoria a corto y largo plazo) se retiró la plataforma de la piscina. Se llevó a cabo un único pase

por día (60 segundos) y se midió el tiempo que el animal nadaba en el cuadrante donde antes estaba la plataforma.

Resultados y conclusión

El tratamiento combinado con ondansetrón, 0,1 µg/kg, y flumazenilo, 10 mg/kg, es capaz de revertir totalmente el déficit cognitivo inducido por la escopolamina (Fig. 1). Estos resultados sugieren que la administración combinada de ondansetrón y flumazenilo podría suponer una nueva aproximación terapéutica en futuros estudios del tratamiento de los déficit cognitivos asociados a una hipofunción colinérgica.

Lesión selectiva colinérgica

Actualmente, para producir una lesión selectiva colinérgica se utiliza la toxina 192-IgG-saporina, formada por un anticuerpo monoclonal del receptor p75 (NGF) unido a la saporina, proteína inactivadora de los ribosomas. Dado que la mayor parte de las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal son p75-positivas, la 192-IgG-saporina es la toxina disponible más selectiva para destruir la inervación colinérgica al hipocampo y la corteza de rata.[16] La lesión se produce por inyección estereotáxica de la toxina en el núcleo colinérgico elegido, y la caracterización de la lesión se puede hacer por cuantificación de los marcadores colinérgicos: actividades acetilcolintransferasa o acetilcolinesterasa.

Experimento

Estudio comparativo de los efectos sobre la memoria de una lesión selectiva colinérgica intracerebroventricular o localizada en el núcleo basal de Meynert.[17]

Los núcleos colinérgicos del telencéfalo basal proyectan y son origen de la inervación colinérgica a todo el cerebro. Una lesión selectiva colinérgica en el núcleo basal de Meynert priva de la inervación colinérgica a la corteza frontal, mientras que una lesión no selectiva

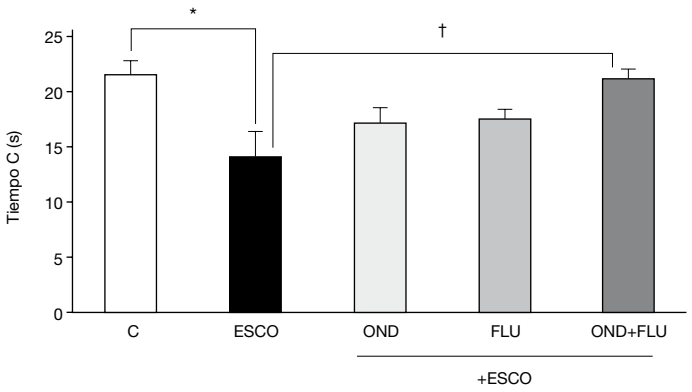


*Figura 1. Efecto del ondansetrón (OND, 0,1 µg/kg), el flumazenilo (FLU, 10 mg/kg) y el tratamiento combinado (OND+FLU) sobre los déficit cognitivos inducidos por escopolamina (ESCO, 0,6 mg/kg), en la fase de retención del laberinto acuático de Morris. Los datos mostrados expresan el tiempo que los animales nadan en el cuadrante donde se encontraba la plataforma en la fase de adquisición (C) (n = 8-10 por grupo). El análisis estadístico consistió en un ANOVA de dos criterios (criterio ondansetrón y criterio flumazenilo, seguido de un test a posteriori de Tukey). Se vio que existía interacción de ambos tratamientos [$F_{1,31}$ = 18,55, p <0.01]. *p <0.01 frente a control, †p <0.05 frente a escopolamina.*

anatómicamente, como es el caso de la lesión intracerebroventricular, priva de la inervación colinérgica a la mayor parte de las estructuras cerebrales.

Resultados y conclusión

Siete días después de una lesión selectiva colinérgica, tanto la lesión del núcleo basal de Meynert como la intracerebroventricular produjeron una reducción de los marcadores colinérgicos en la corteza frontal de alrededor del 40%. Sin embargo, como era de esperar, en el hipocampo se obtuvieron descensos en los marcadores colinérgicos sólo en el caso de la lesión intracerebroventricular.

Únicamente los animales con lesión intracerebroventricular mostraron déficit cognitivos en la prueba del laberinto acuático de Morris, tanto en la adquisición como en la retención (Fig. 2), mientras que los animales con lesión del núcleo basal de Meynert no mostraron ninguna alteración en el aprendizaje ni en la memoria. Estos resultados parecen apoyar la idea de que la memoria espacial no depende de la integridad de la corteza frontal, y que es en los casos en que la inervación del hipocampo se ve afectada cuando se pueden apreciar los déficit cognitivos, al menos en la prueba del laberinto acuático de Morris.

La depresión: un ejemplo de déficit cognitivo asociado

La depresión es uno de los problemas de salud más importantes. Aunque se desconocen los mecanismos neurobiológicos de la depresión, y superada la clásica teoría monoaminérgica, cada vez es mayor la evidencia que implica a una respuesta alterada al estrés en ciertas formas o componentes de la depresión.[18-20] Basándose en esto y en la dificultad de encontrar modelos animales de depresión, en los últimos años se está prestando especial atención a los modelos basados en una respuesta alterada al estrés, como son la separación materna o el estrés crónico suave.

La separación materna, modelo de respuesta alterada al estrés

Se ha demostrado que tiempos prolongados (más de una hora) de separación materna

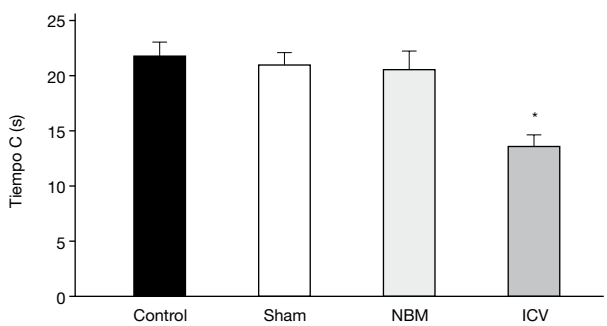


*Figura 2. Efectos sobre los procesos de aprendizaje y memoria medidos en el laberinto acuático de Morris, en la fase de retención, con una lesión selectiva colinérgica con 192 IgG-saporina en el núcleo basal de Meynert o intracerebroventricular. Los datos que se muestran son el tiempo que los animales nadan en el cuadrante donde se encontraba la plataforma en la fase de adquisición (C) (n = 6-21 por grupo). El análisis estadístico realizado fue un ANOVA de un criterio (lesión) seguido del test de Tamhane ($F_{3,62}$ = 3,670; *p = 0.017 frente a control, Sham y lesiones del núcleo basal de Meynert).*

durante las primeras semanas de vida dan origen, al llegar a adultos, a animales con signos neuroendocrinos y de comportamiento de una hiperreactividad al estrés.[21-24] Así, estos animales muestran un aumento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de la natación forzada de Porsolt, y anhedonia. Este endofenotipo se acompaña de una alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), que es el principal sistema efector de las respuestas mediadas por estrés en el organismo.[25]

Hay importantes alteraciones en la memoria en los trastornos psiquiátricos asociados al estrés.[26,27] Los animales macho sometidos a separación materna muestran un déficit cognitivo en la retención en el laberinto acuático de Morris; sin embargo, las hembras no muestran ningún déficit en esta prueba (Fig. 3). Estos datos podrían indicar que, en respuesta a un estrés adicional (como puede ser el agua del laberinto acuático), las ratas hembra muestran un mejor comportamiento que los machos. En general se sabe que las hembras parecen ser más resistentes que los machos a los efectos del estrés sobre la memoria, y que las hembras tienen mejor memoria espacial.[28] En este caso, para evitar tales diferencias entre sexos, en el estudio de las alteraciones cognitivas que acompañan a la depresión resulta útil el modelo del reconocimiento de nuevo objeto.

Prueba del reconocimiento de nuevo objeto

Se puede definir la memoria de reconocimiento como la habilidad para discriminar lo nuevo de lo familiar. Dos investigadores, Ennaceur y Delacour, desarrollaron un paradigma animal de reconocimiento de objetos basado en la tendencia natural de los roedores a explorar más los objetos nuevos que los familiares. Se ha propuesto que esta tarea mantiene una clara analogía con las pruebas de reconocimiento que se usan ampliamente en humanos para evaluar la memoria y que sirven para caracterizar los síndromes amnésicos, ya que proporcionan un índice de la gravedad del daño de la memoria explícita. Este paradigma cognitivo puede utilizarse para medir la participación de las estructuras del lóbulo temporal en la formación de la memoria de reconocimiento a corto (90 minutos) y largo plazo (más de 24 horas). A diferencia del aprendizaje espacial, la corteza frontal y no el hipocampo es la que parece estar más estrechamente relacionada con este tipo de aprendizaje y memoria.[29-33]

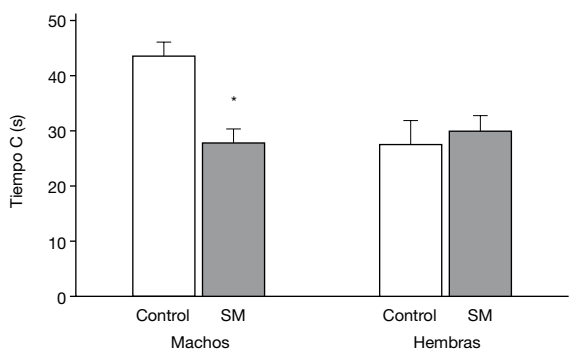


Figura 3. Efecto de la separación materna en la prueba del laberinto acuático de Morris, en la fase de retención, en ratas macho y hembra. Los datos que se muestran son el tiempo que los animales nadan en el cuadrante donde se encontraba la plataforma durante la fase de adquisición (C) (n = 12 por grupo). El análisis estadístico fue una prueba t *de Student comparando control con separación materna. *p <0.05 frente a control.*

Experimento

Reversión de los déficit cognitivos presentes en el modelo de separación materna en rata[25] (Marcos et al., observaciones no publicadas).

Equipo y protocolo

Los descritos a continuación están adaptados de Ennaceur y Delacour.[34] El campo abierto consiste en un cuadrado negro (65 × 65 × 45 cm). El día previo al experimento, los animales se familiarizan con el campo durante 30 minutos. En el primer pase del experimento se muestran a los animales dos objetos similares en cuanto a color, forma, tamaño y textura, y se colocan equidistantes de los bordes (10 cm). El animal se sitúa en el centro del campo y se le permite explorar libremente durante 5 minutos. Se considera exploración cuando la cabeza del animal se orienta hacia el objeto y su nariz está situada a menos de 2 cm de él. Una hora más tarde se lleva a cabo el segundo pase (5 minutos), tras remplazar uno de los objetos por otro nuevo, y se mide el tiempo de exploración. Los resultados se expresan como porcentaje de tiempo explorando el nuevo objeto en relación con el tiempo total de exploración (índice de discriminación).

Resultados y conclusiones

En la prueba de reconocimiento de objeto no se encontraron diferencias en el tiempo que las ratas exploran dos objetos idénticos. Al sustituir uno de los objetos por otro nuevo, los animales exploran un tiempo significativamente superior el objeto nuevo. Sin embargo, los animales que habían sido separados de sus madres, tanto machos como hembras, mostraron un déficit cognitivo, con un índice de discriminación en los animales con separación materna cercano a 50.

La administración de un antagonista de los receptores 5-HT_6, como el compuesto SB-271046, consiguió revertir el déficit cognitivo asociado a la separación materna (Fig. 4A). Sin embargo, los datos bibliográficos parecen apoyar la idea de que son los agonistas 5-HT_6 los que se muestran más efectivos como antidepresivos,[35] por lo que no está clara la posible utilidad de los antagonistas 5-HT_6 en el caso de las alteraciones cognitivas asociadas a la depresión.

En este mismo modelo se ha descrito que las alteraciones cognitivas podrían deberse a la alteración del eje HPA, en concreto a un exceso de glucocorticoides circulantes[25]. Por lo tanto, teóricamente, un antagonista de los recepto-

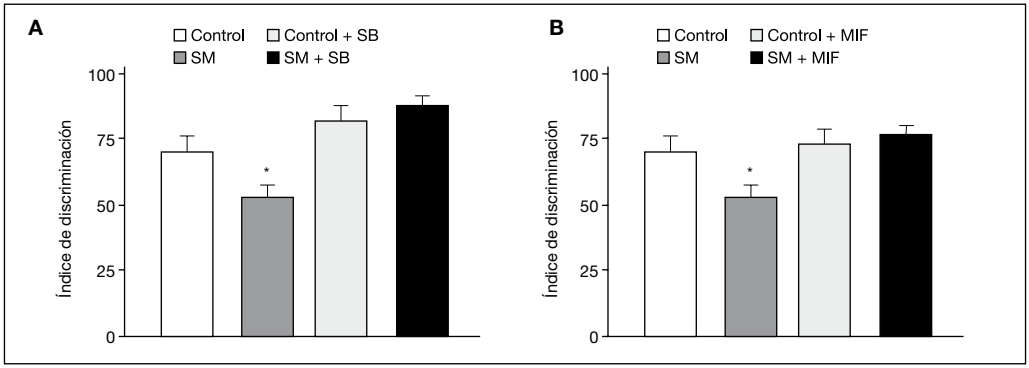


Figura 4. Efecto del tratamiento A) con un antagonista 5-HT_6 (SB-271046, 10 mg/kg) y B) con mifepristona (10 mg/kg) en los déficit cognitivos inducidos por la separación materna en la prueba de reconocimiento de nuevo objeto (n = 8-12 por grupo). El estudio estadístico mostró una interacción significativa entre el estrés neonatal (separación materna) y el tratamiento con SB-271046 ($F_{1,51}$ = 5,280, p <0.05) o mifepristona ($F_{1,43}$ = 4,83, p <0.05). El análisis a posteriori con la prueba t *de Student reveló que los animales separados de sus madres tratados con SB-271046 o mifepristona no mostraban ningún déficit cognitivo.*

res de glucocorticoides, como la mifepristona, debería revertir los déficit cognitivos asociados a la separación materna. Al estudiar el efecto de la mifepristona vimos que este fármaco no sólo es eficaz para revertir los déficit cognitivos (Fig. 4B), sino que también disminuye el tiempo de inmovilidad en la prueba de la natación forzada de Porsolt. Todos estos datos parecen sugerir una posible utilidad de la mifepristona para el tratamiento de los trastornos afectivos y las alteraciones cognitivas asociadas.[25] Actualmente la mifepristona está en fase 3 de ensayo clínico para el tratamiento de la depresión mayor, y puede ser el primer antidepresivo no monoaminérgico del mercado.

Conclusiones

Para los estudios funcionales en aprendizaje y memoria se han desarrollado diversas pruebas. A la hora de elegir qué prueba utilizar hay que tener en cuenta las particularidades de cada modelo, en cuanto a sustrato anatómico y tipo de aprendizaje, ya que podemos encontrarnos resultados inesperados o incluso contradictorios. Los modelos funcionales de aprendizaje y memoria aquí presentados pueden utilizarse tanto para estudiar los mecanismos anatomopatológicos causantes de enfermedades como para evaluar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de los déficit cognitivos característicos o asociados a diversas afecciones neuropsiquiátricas, como la enfermedad de Alzheimer y la depresión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Woolley ML, Bentley JC, Sleight AJ, Marsden CA, Fone KC. A role for 5-HT_6 receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. Neuropharmacol. 2001;41:210-9.
2. Meneses A. Effects of the 5-HT_6 receptor antagonist Ro 04-6790 on learning consolidation. Behav Brain Res. 2001;118:107-10.
3. Hirst WD, Abrahamsen B, Blaney FE, Calver AR, Aloj L, Price GW, et al. Differences in the central nervous system distribution and pharmacology of the mouse 5-hydroxytryptamine-6 receptor compared with rat and human receptors investigated by radioligand binding, site-directed mutagenesis, and molecular modeling. Mol Pharmacol. 2003;64:1295-308.
4. Hirst WD, Moss SF, Bromidge SM, Riley G, Stean TO, Rogers SC. Characterization of SB-399885, a potent and selective 5-HT_6 receptor antagonist. Soc Neurosci Meet. 2003;576:7.
5. King MV, Sleight AJ, Woolley ML, Topham IA, Marsden CA, Fone KC. 5-HT_6 receptor antagonists reverse delay-dependent deficits in novel object discrimination by enhancing consolidation – an effect sensitive to NMDA receptor antagonism. Neuropharmacol. 2004;47:195-204.
6. Rogers DC, Hagan JJ. 5-HT_6 receptor antagonists enhance retention of a water maze task in the rat. Psychopharmacol. 2001;158:114-9.
7. Foley AG, Murphy KJ, Hirst WD, Gallagher HC, Hagan JJ, Upton N, et al. The 5-HT_6 receptor antagonist SB-271046 reverses scopolamine-disrupted consolidation of a passive avoidance task and ameliorates spatial task deficits in aged rats. Neuropsychopharmacol. 2004;29:93-100.
8. Russell MG, Dias R. Memories are made of this (perhaps): a review of serotonin 5-HT(6) receptor ligands and their biological functions. Curr Topics Med Chem. 2002;2:643-54.
9. Lindner MD, Hodges DB Jr, Hogan JB, Orie AF, Corsa JA, Barten DM, et al. An assessment of the effects of serotonin 6 (5-HT_6) receptor antagonists in rodent models of learning. J Pharmacol Exp Ther. 2003;307:682-91.
10. Pérez-García G, Meneses A. Oral administration of the 5-HT6 receptor antagonists SB-357134 and SB-399885 improves memory formation in an autoshaping learning task. Pharmacol Biochem Behav. 2005;81:673-82.
11. Ávila J. Tau aggregation into fibrillar polymers: taupathies. FEBS Lett. 2000;30:89-92.
12. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science. 1982;217:408-14.
13. Morris R. Developments of a water maze procedure for studing spatial learning in the rat. J Neurosci Meth. 1984;11:47-60.
14. Díez-Ariza M, Redondo C, García-Alloza M, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Flumazenil and tacrine increase the effectiveness of ondansetron on scopolamine-induced impairment of spatial learning in rats. Psychopharmacol. 2003;169:35-41.

15. Díez-Ariza M, García-Alloza M, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. GABA(A) receptor antagonists enhance cortical acetylcholine release induced by 5-HT(3) receptor blockade in freely moving rats. Brain Res. 2002;956:81-5.
16. Torres EM, Perry, TA, Blockland A, Wilkinson LS, Wiley RG, Lappi DA, et al. Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. Neuroscience. 1994;63:95-122.
17. García-Alloza M, Zaldua N, Díez-Ariza M, Marcos B, Lasheras B, Gil-Bea FJ, et al. Effect of selective cholinergic denervation on the serotonergic system: implications for learning and memory. J Neuropathol Exp Neurol. 2006;65:1074-81.
18. Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. Clinical characteristics of major depression that predict risk of depression in relatives. Arch Gen Psychiatry. 1999;56:322-7.
19. Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. Annu Rev Psychol. 1997;48:191-214.
20. Van Praag HM. Can stress cause depression? Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2004;28:891-907.
21. Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? Int J Dev Neurosci. 1998; 16:149-64.
22. Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. Prog Brain Res. 2000;122:81-103.
23. Lehmann J, Feldon J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? Rev Neurosci. 2000;11:383-408.
24. Ploj K, Roman E, Nylander I. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. Neuroscience. 2003;121:787-99.
25. Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. Psychoneuroendocrinol. 2007;32:256-66.
26. Bremner JD, Narayan M. The effects of stress on memory and the hippocampus throughout the life cycle: implications for childhood development and aging. Dev Psychopathol. 1998;10:871-85.
27. Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Southwick SM, McGlashan T, Staib LH, et al. Neural correlates of declarative memory for emotionally valenced words in women with posttraumatic stress disorder related to early childhood sexual abuse. Biol Psychiatry. 2003;53:879-89.
28. Luine V. Sex differences in chronic stress effects on memory in rats. Stress. 2002;5:205-16.
29. Brown MW, Aggleton JP. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? Nat Rev Neurosci. 2001;2:51-61.
30. Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. Exp Brain Res. 1997;113:509-19.
31. Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. Neurobiol Learning Mem. 2004;82:26-34.
32. Kirchhoff BA, Wagner AD, Maril A, Stern CE. Prefrontal-temporal circuitry for episodic encoding and subsequent memory. J Neurosci. 2000;20:6173-80.
33. Xiang JZ, Brown MW. Neuronal responses related to long-term recognition memory processes in prefrontal cortex. Neuron. 2004;42:817-29.
34. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behav Brain Res. 1988;31:47-59.
35. Svenningsson P, Tzavara ET, Qi H, Carruthers R, Witkin JM, Nomikos GG, et al. Biochemical and behavioral evidence for antidepressant-like effects of 5-HT6 receptor stimulation. J Neurosci. 2007;27:4201-9.

DISCUSIÓN

C. Goicoechea: ¿Cómo discrimináis en el test de Morris qué parte se debe al aprendizaje y cuál a la ansiedad producida por el mismo test? Sobre esta prueba había leído que se situaba al animal en frente de la plataforma y luego se ocultaba para ver si era capaz de llegar al mismo lugar. ¿Qué diferencias hay con el método que nos has explicado?

M.J. Ramírez: Hay distintos protocolos para desarrollar un laberinto acuático de Morris. El que os he mostrado es el de plataforma invisible, en el cual el animal aprende por las pistas externas. El protocolo que mencionas es el de plataforma visible, que se utiliza cuando tenemos la sospecha de que la capacidad visual del animal está afectada. Por ejemplo, en general, cuando trabajamos con ratones, primero realizamos una plataforma visible y a continuación una invisible, que es la que en realidad nos aporta el dato de memoria.

P. Robledo: ¿El test de Morris es válido para el Alzheimer?

M.J. Ramírez: Es un modelo que gusta mucho porque en el Alzheimer la primera área y la más profundamente afectada es el hipocamo y la corteza entorrinal, que precisamente son el sustrato anatómico del laberinto acuático de Morris.

M.J. Sanz: En referencia a las diferencias observadas entre hembras y machos, ¿habéis probado si con un antagonista de un receptor estrogénico cambian las respuestas?

M.J. Ramírez: En la bibliografía está descrito, pero nosotros, por motivos técnicos, no lo hemos podido realizar. Lo primero que se debe hacer es controlar el ciclo de la rata para ver en qué momento puedes realizar la prueba.

A.M. Planas: Sobre este mismo tema, ¿se ha probado utilizando ratas ovariectomizadas?

M.J. Ramírez: Sí, pero nosotros no lo hemos realizado.

A.M. Planas: Nos has comentado que las hembras responden mejor al estrés. ¿Habéis observado si suben los valores de corticosteroides en plasma en respuesta al estrés y si hay diferencias entre machos y hembras?

M.J. Ramírez: Sí, en la prueba de separación materna (modelo de respuesta alterada al estrés) se observa un aumento significativo de los corticosteroides en los animales separados, tanto en machos como en hembras.

A.M. Planas: A partir de estos resultados me planteo cómo afectará a la sociedad que las mujeres trabajen, ya que si en ratones, con sólo separarlos unas horas, ya induce esta depresión, las futuras generaciones…

S. Erill: Considerando el efecto antiglucocorticoide de la progesterona, si pensamos que el parto es un proceso de cesación brusca de concentraciones altas de progesterona, a lo mejor la depresión posparto tiene algo que ver con todo esto.

M.J. Ramírez: Y los problemas cognitivos, porque siempre dicen que después del parto es mejor no estudiar demasiado.

M.I. Colado: ¿Tienes datos del ondansetrón y el flumazenilo sobre la actividad locomotora de los animales en el test del laberinto acuático?

M.J. Ramírez: Sí, y no afectan. La primera prueba que hicimos fue la de actividad motora, porque un animal con una actividad motora elevada sesgaría los resultados.

J.M. Baeyens: Tal vez se debería ser algo más prudente respecto a la generalización sobre la limitada capacidad de aprendizaje de los

ratones. Sólo me gustaría añadir que probablemente también dependerá de la cepa que se utilice.

M.J. Ramírez: No se puede generalizar, pero daré solamente un apunte: un protocolo de Morris normal es un día de habituación, dos de adquisición y puedes hacer una retención al día siguiente y a los cuatro días, por ejemplo. Cuando trabajas con ratones (nosotros utilizamos los C55) se necesita un día de habituación, tres o cuatro días de plataforma visible, seis a ocho días de adquisición y luego la retención.

A. Badía: Cuando utilizáis inhibidores de la acetilcolinesterasa en el laberinto acuático de Morris, ¿cuánto tiempo tarda el animal en mostrar signos de aprendizaje?

M.J. Ramírez: El segundo día ya muestra signos de aprendizaje.

Problemática de los estudios de las interacciones farmacodinámicas entre antiepilépticos

J.A. Armijo[1] y A. Cuadrado[2]

[1]Catedrático de Farmacología Clínica, Universidad de Cantabria,
y Jefe del Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander;
[2]Especialista en Farmacología Clínica, FEA de Aparato Digestivo, Hospital Comarcal de Laredo.

Resumen: *El tratamiento antiepiléptico actual es sintomático, pero no previene ni cura la epilepsia. Por otra parte, a pesar de la autorización de once nuevos antiepilépticos, algunos con nuevos mecanismos de acción, sigue habiendo un 30% de pacientes resistentes. Se necesitan modelos que identifiquen la eficacia en estas epilepsias resistentes, así como el efecto antiepileptógeno. En los pacientes resistentes suele recurrirse a la politerapia, pero la asociación de antiepilépticos no siempre produce efectos beneficiosos. Los estudios en animales pueden ser útiles para saber qué asociaciones pueden producir efectos aditivos, supraaditivos o infraaditivos, para averiguar si pueden ser beneficiosas o perjudiciales, y para descartar que puedan deberse a mecanismos farmacocinéticos. Se presenta un estudio en ratones para identificar posibles asociaciones beneficiosas, en el cual se comparan los efectos anticonvulsionantes y neurotóxicos de dosis crecientes de valproato, felbamato, lamotrigina, gabapentina y vigabatrina en monoterapia y en asociación con una dosis baja de otro antiepiléptico en los modelos de 4-aminopiridina, pentilentetrazol, picrotoxina y rotarod. Se observó con más frecuencia un aumento de los efectos anticonvulsionantes que de los neurotóxicos. Se identificaron nueve asociaciones beneficiosas (cinco con 4-aminopiridina, tres con pentilentetrazol y una con picrotoxina). Las asociaciones beneficiosas se observaron más con los antiepilépticos de amplio espectro (valproato, lamotrigina y felbamato) que con los de espectro reducido (gabapentina y vigabatrina). Nuestros resultados sugieren que los antiepilépticos de amplio espectro, como el valproato y la lamotrigina, pueden ser más adecuados para utilizar en asociación que los de espectro reducido, y que el modelo de la 4-aminopiridina puede ser adecuado para detectar asociaciones beneficiosas.*

Palabras clave: Fármacos antiepilépticos – Politerapia – Interacciones – Espectro antiepiléptico.

Introducción

El tratamiento actual de la epilepsia es sintomático e impide que las crisis se inicien o se propaguen, pero no previene ni cura la epilepsia. La comercialización de once nuevos antiepilépticos en las dos últimas décadas no ha cambiado sustancialmente el porcentaje de pacientes resistentes al tratamiento, que sigue siendo del 30%.[1] La farmacorresistencia es un gran problema para el paciente por la persistencia de las crisis, la morbilidad derivada de la epilepsia y de la medicación, el aislamiento social, el desempleo y la disminución de la calidad de vida,[2] pero además supone la mayor parte del coste sanitario de la epilepsia.[3] Así pues, es necesario mejorar el tratamiento antiepiléptico y desarrollar nuevas estrategias.

Es indudable que la investigación sobre las epilepsias humanas debe hacerse en humanos

debido a la dificultad de extrapolar los datos del animal al hombre. Sin embargo, a pesar de los avances en técnicas no invasivas como la neuroimagen y de los estudios en pacientes con cirugía de la epilepsia, hay aspectos que son difíciles de investigar en humanos. Por ello, los modelos animales siguen siendo esenciales para estudiar a qué se deben las epilepsias y cómo se inician, propagan y terminan las crisis epilépticas; son necesarios para analizar los mecanismos por los que actúan los antiepilépticos y para diseñar y desarrollar nuevas estrategias que eviten la epileptogénesis, la progresión de la epilepsia y la farmacorresistencia.[3]

En los pacientes epilépticos farmacorresistentes es habitual que se recurra a la politerapia. Las interacciones de los antiepilépticos son frecuentes y relevantes, y pueden ser beneficiosas, pero también perjudiciales. Por ello se debe realizar una politerapia racional, es decir, seleccionar la asociación de antiepilépticos más adecuada a las características del paciente y de su epilepsia, teniendo en cuenta el mecanismo de acción, el espectro antiepiléptico, la tolerabilidad, las características farmacocinéticas y la posibilidad de interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas.[4]

Los estudios de las interacciones farmacodinámicas en humanos son difíciles, y la mayoría de los realizados tienen problemas metodológicos, por lo que se puede considerar que no hay ningún ensayo clínico controlado que avale el beneficio de una determinada asociación.[4-6]

Tras una primera parte sobre las necesidades de modelos funcionales de epilepsia en animales, las posibilidades de interacciones beneficiosas y perjudiciales, y la problemática de los estudios de interacciones farmacodinámicas, se presenta un estudio realizado por nuestro grupo en el que se comparan los efectos de dosis crecientes de valproato, felbamato, lamotrigina, gabapentina y vigabatrina en monoterapia y en asociación con una dosis baja de otro antiepiléptico en los modelos de 4-aminopiridina, pentilentetrazol, picrotoxina y rotarod, valorando los efectos sobre las concentraciones cerebrales de los antiepilépticos, de GABA y de glutámico.

Modelos funcionales de epilepsia en animales

Los modelos funcionales de epilepsia se utilizan para identificar los mecanismos que provocan el comienzo, la sincronización y la propagación de las descargas epilépticas. Además, los estudios electrofisiológicos y de neuroimagen contribuyen al diagnóstico y la tipificación de la epilepsia, así como a la identificación del foco epiléptico. Tanto los modelos funcionales como los estudios electrofisiológicos y de neuroimagen pueden servir para identificar y valorar el efecto antiepiléptico de los nuevos fármacos.

Estudio de los mecanismos básicos

Las epilepsias pueden ser genéticas o adquiridas. En las genéticas puede haber: a) una anomalía en los canales iónicos que intervienen en la excitabilidad de las neuronas (canalopatías), b) alteraciones del metabolismo que influyan en la estructura y la función de las neuronas, o c) alteraciones en la migración neuronal. En las epilepsias adquiridas hay una lesión originada por traumatismos, infecciones, alteraciones vasculares cerebrales, tumores o enfermedades degenerativas que, por sí sola o favorecida por un sustrato genético, provoca cambios en las neuronas del foco mediante un proceso de epileptogénesis que aumenta su excitabilidad haciendo que descarguen de una forma paroxística e hipersíncrona.[7,8]

En algunos tipos de epilepsia se produce una progresión de la enfermedad inducida por las propias crisis,[9] y en otras se desarrollan mecanismos de resistencia que hacen que la epilepsia sea o se vuelva resistente al tratamiento farmacológico.[10,11]

Los modelos de convulsiones agudas se utilizan para estudiar los mecanismos que inician y terminan la convulsión provocada por el estímulo, pero estos mecanismos pueden ser diferentes de los que inician las crisis espontáneas sin estímulos desencadenantes.

Los modelos de convulsiones crónicas estudian los fenómenos que provocan la epilep-

togénesis, como la excitotoxicidad, la plasticidad neuronal y la reorganización sináptica, los cambios en los canales iónicos dependientes de voltaje y en los receptores de los neurotransmisores, así como la activación de los astrocitos. El *kindling* es el modelo de epilepsia mesial temporal más popular, pero tiene el inconveniente de que no presenta crisis epilépticas espontáneas y deben provocarse mediante estímulos.

Las epilepsias genéticas, como la de la rata GAERS (*Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasburgh*) o el ratón Lethargic, pueden utilizarse como modelos de las ausencias humanas. La identificación de canalopatías como causa de algunas epilepsias genéticas ha abierto la posibilidad de disponer de animales en los que se han provocado estas mutaciones para estudiar sus anomalías; el problema es que el fenotipo de estas mutaciones en los animales no siempre refleja el humano.[12] Las epilepsias genéticas han puesto de manifiesto que las anomalías en un gen pueden producir diversos fenotipos epilépticos, y que el mismo fenotipo epiléptico puede deberse a mutaciones en diferentes genes.[7] Queda por establecer si la respuesta al tratamiento se asocia mejor al fenotipo (por ejemplo, tipo de crisis) o al genotipo (por ejemplo, tipo de canalopatía).

En el diseño de un modelo de epilepsia en animales es importante conseguir que la eficacia en el modelo refleje la eficacia en la epilepsia humana. En la actualidad no hay una gran correspondencia entre ambas y, por ello, se está replanteando la clasificación de las crisis epilépticas para que contemple aspectos fisiopatológicos, sustrato anatómico, respuesta al tratamiento antiepiléptico, patrón EEG, patrón de propagación y consecuencias postictales.[13] Por ejemplo, se discute la distinción entre una crisis focal simple y una compleja (ya que puede ser difícil de valorar la pérdida de conciencia), así como la consideración de crisis generalizada, ya que no siempre se puede identificar el lugar donde se inicia la crisis.[3] De igual forma, la clasificación en idiopáticas, criptogénicas y sintomáticas se va sustituyendo por genéticas y adquiridas, sin que las genéticas se correspondan con las idiopáticas, ya que las canalopatías pueden ser el sustrato genético necesario para que se manifieste una epilepsia adquirida.

Puesto que las epilepsias adquiridas pueden ser multifactoriales, es decir, la suma de una agresión exógena y de una predisposición genética, se requieren nuevos modelos de animales con predisposición genética en los que se provoque una epilepsia adquirida.[3]

Diagnóstico mediante estudios electrofisiológicos y de neuroimagen

El diagnóstico y la tipificación de la epilepsia, así como la localización del foco epiléptico mediante el EEG o la neuroimagen, son muy importantes para el tratamiento. Aunque estos estudios se han desarrollado directamente en humanos, la utilización de modelos en animales puede contribuir a su comprensión y aplicación. Por ejemplo, los *fast ripples* son oscilaciones breves de alta frecuencia que podrían corresponder a múltiples cambios paroxísticos de despolarización hipersíncronos procedentes de áreas capaces de generar descargas epilépticas.[12] Por tanto, su detección permitiría diagnosticar la epilepsia, localizar el foco que la provoca y valorar la respuesta al tratamiento. El problema es que requiere métodos invasivos que pongan en contacto el electrodo con el cerebro, por lo que su estudio debe hacerse en animales. Se necesita desarrollar una herramienta que permita detectarlos en la práctica clínica. Con los mismos objetivos se está estudiando la magnetoencefalografía o una combinación de resonancia magnética funcional y EEG.[3] También se están investigando nuevas estrategias electrofisiológicas que avisen del comienzo de una crisis y posibiliten tomar medidas que la aborten.[14]

Los estudios de neuroimagen permiten valorar aspectos estructurales, funcionales y metabólicos del posible foco epiléptico. Los modelos en animales permiten analizar aspectos como el curso temporal. Por ejemplo, la resonancia magnética se ha utilizado para relacionar aspectos estructurales, como la proli-

feración de las fibras musgosas o los patrones de displasia cortical, con la epileptogénesis. Los estudios funcionales de tomografía de emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa, basados en estudios en animales con autorradiografía 2DG, diferencian entre las crisis con bajo y alto metabolismo. Otros trazadores, como el α-metil triptófano, se están utilizando como marcadores de la epileptogénesis. La combinación de EEG y resonancia magnética funcional puede diferenciar entre las puntas interictales que se originan en el foco de las que se originan en otros lugares, contribuyendo a la localización del foco epiléptico. También permiten valorar con mayor rapidez la respuesta al tratamiento antiepiléptico, sin tener que esperar a que se produzcan nuevas crisis.[3]

Valoración del efecto antiepiléptico

Identificación del efecto antiepiléptico de nuevos fármacos

Se ha hecho valorando su efecto en dos modelos de convulsiones agudas: el electrochoque máximo y el pentilentetrazol. Inicialmente se consideró que la eficacia en el electrochoque máximo reflejaba la eficacia en las convulsiones tonicoclónicas y las crisis focales humanas, y que la eficacia en el pentilentetrazol reflejaba la eficacia en las ausencias humanas. Sin embargo, en la Tabla I podemos ver varios problemas de estos modelos:[15,16]

- Hay fármacos, como el levetiracetam, que no son eficaces en el electrochoque máximo ni en el pentilentetrazol.
- Hay fármacos, como la tiagabina y la vigabatrina, que son eficaces en el pentilentetrazol, pero empeoran las ausencias.
- Hay fármacos, como la tiagabina y la vigabatrina, que no son eficaces en el electrochoque máximo y sí lo son frente a crisis focales.

Como consecuencia, se han introducido algunos matices en el cribado de nuevos fármacos antiepilépticos (Fig. 1):

- El modelo del electrochoque máximo se considera que predice el efecto en las crisis tonicoclónicas (ya que todos los que son eficaces en este test tienen este efecto), pero no en las crisis focales, ya que la tiagabina, la vigabatrina y el levetiracetam son eficaces en las crisis focales y no lo son en este modelo.
- El modelo del pentilentetrazol ha dejado de considerarse un modelo antiausencias, ya que el fenobarbital, la tiagabina y la vigabatrina, que son eficaces en este modelo, empeoran las ausencias.
- En caso de ineficacia en el modelo del electrochoque máximo y del pentilentetrazol, se valora el efecto en las crisis psicomotoras inducidas por estímulos de 6 Hz a 44 mA durante tres segundos. Este modelo, que mimetiza una crisis focal, detecta el efecto del levetiracetam y del valproato, pero no el de la fenitoína, la carbamacepina, la lamotrigina y el topiramato, por lo que se ha sugerido que puede detectar la eficacia en epilepsias farmacorresistentes.

En caso de eficacia en cualquiera de los tres modelos se valora el efecto sobre el *kindling* hipocampal y sobre modelos de ausencias como el de la γ-butirolactona, las ratas GAERS y los ratones Lethargic, que tienen un patrón EEG punta-onda y predicen tanto el efecto antiausencias como el efecto proausencias. Además, suele valorarse su eficacia en los modelos de la bicuculina (un antagonista del receptor $GABA_A$) y de la picrotoxina (un bloqueante del canal de cloro de ese receptor), así como en los ratones Frings suceptibles a crisis audiogénicas que son modelo de epilepsia refleja (Fig. 1).[15,16]

El *kindling* refleja mejor la eficacia frente a las crisis focales complejas, ya que todos los antiepilépticos eficaces en estas crisis son eficaces en este modelo, pero es un modelo de epilepsia crónica más caro y largo, lo que limita su uso como primera opción. De igual forma, las epilepsias genéticas son también demasiado caras para utilizarlas como primera opción en la identificación de efectos antiepilépticos. Se necesitan nuevos modelos senci-

TABLA I. Correlación entre la eficacia de los antiepilépticos en modelos de convulsiones en animales y la eficacia en los humanos.[16]

Modelo	*Eficacia en convulsiones tonicoclónicas, ¿y focales?*	*Eficacia en crisis mioclónicas, ¿y ausencias?*	*Eficacia en ausencias*	*Eficacia en crisis focales*
Electrochoque máximo (extensión tónica)	CBZ, FBM, GBP, LTG, PB, PHT, TPM, VPA, ZNS			
Pentilentetrazol s.c. (clonías)		BZD, ESM, FBM, GBP, PB, TGB, VGB, VPA		
Modelos de patrón EEG punta-onda			BZD, ESM, LEV, LTG, TPM, VPA	
Kindling hipocampal				BZD, CBZ, FBM, GBP, LEV, LTG, PB, PHT, TGB, TPM, VGB, VPA, ZNS
Kindling en ratas resistentes a la PHT				FBM, GBP, LEV, LTG, TPM
Electrochoque de 6 Hz (crisis piscomotoras)				LEV, VPA

BZD: benzodiacepinas; CBZ: carbamacepina; ESM: etosuximida; FBM: felbamato; GBP: gabapentina; LEV: levetiracetam; LTG: lamotrigina; PB: fenobarbital; PHT: fenitoína; TGB: tiagabina; TPM: topiramato; VPA: valproato; VGB: vigabatrina; ZNS: zonisamida.

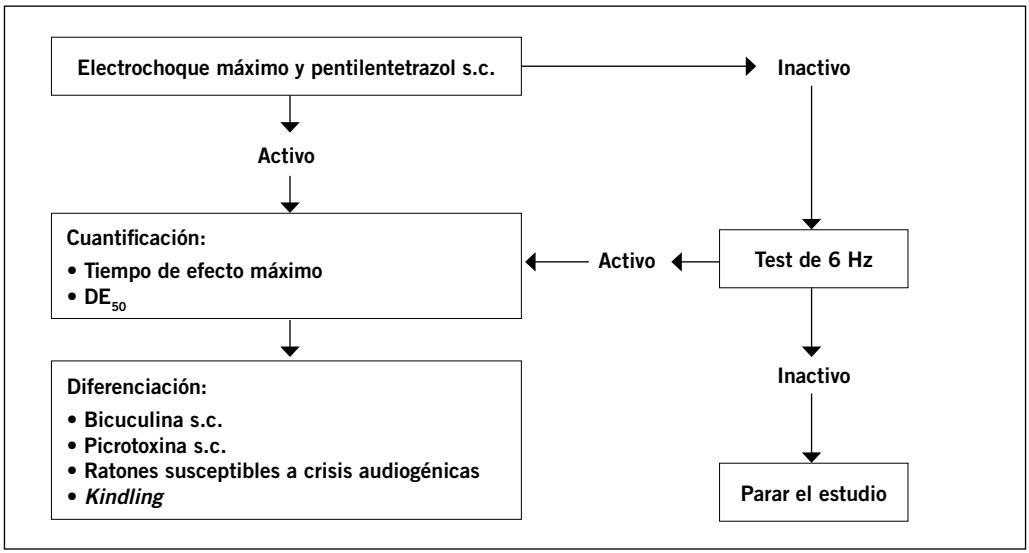


Figura 1. Procedimiento utilizado para la identificación del efecto antiepiléptico de nuevos fármacos en el programa de identificación de nuevos antiepilépticos de la Universidad de Utah.[16]

llos y eficaces que permitan detectar el efecto antiepiléptico de cualquier nueva sustancia, independientemente del tipo de crisis y del mecanismo por el que actúen. Otra posibilidad es utilizar parámetros subrogados, como el efecto sobre el *fast ripple* o el efecto sobre el patrón EEG-resonancia magnética funcional comentados anteriormente.[3]

Identificación de antiepilépticos para las epilepsias farmacorresistentes

Los modelos del electrochoque máximo y del pentilentetrazol siguen utilizándose en la identificación de nuevos antiepilépticos (Fig. 1), y de hecho, la mayor parte de los antiepilépticos de primera y segunda generación se han detectado con ellos, independientemente de su mecanismo de acción. Sin embargo, su uso hace que se identifiquen fármacos eficaces en el mismo tipo de crisis y, por tanto, siguen siendo ineficaces en las crisis habitualmente resistentes. Se necesita cambiar de estrategia y desarrollar fármacos que actúen por nuevos mecanismos de acción, así como modelos en animales que valoren la eficacia en las crisis farmacorresistentes.[12,15,16]

Por ejemplo, los modelos de la inhalación de fluoretilo, el *kindling* y las convulsiones por hipertermia e hipoxia neonatales, son intentos de identificar fármacos que sean eficaces en las convulsiones generalizadas infantiles.[16]

El test de 6 Hz a 44 mA y el *kindling* resistente a la fenitoína son ejemplos de modelos orientados a detectar antiepilépticos que sean eficaces en las epilepsias resistentes a la fenitoína. Las ratas resistentes a la fenitoína son también resistentes a otros antiepilépticos, pero siguen siendo sensibles al levetiracetam.[17]

La epilepsia inducida por *status* epiléptico por pilocarpina o estimulación de la amígdala tiene la ventaja, sobre el *kindling*, de que presenta crisis espontáneas, y también se han detectado poblaciones de animales sensibles y resistentes a algunos antiepilépticos.[17] Además, estos modelos permiten estudios cruzados para comparar la eficacia de dos antiepilépticos o de su asociación.[16]

Identificación de fármacos con efecto antiepileptógeno

Los modelos en animales, como el *kindling*, se han utilizado ampliamente para valorar el efecto antiepileptógeno de los fármacos. Por desgracia, en este modelo, la eficacia del fenobarbital, el levetiracetam, el topiramato y el valproato, no se corresponde con la eficacia para prevenir la aparición de epilepsia tras un traumatismo craneoencefálico.[15] Otros modelos de epileptogénesis son la epilepsia producida por *status* epiléptico por pilocarpina o kaínico, y la epilepsia producida por traumatismo cerebral, pero se desconoce si pueden extrapolarse a los humanos.[16] Se necesitan modelos en animales que permitan predecir la eficacia antiepileptógena en los humanos.[18]

En las epilepsias idiopáticas no parece haber este proceso de epileptogénesis. Es posible que el sustrato genético se ponga de manifiesto en el momento del desarrollo en que la maduración del cerebro lo haga especialmente sensible. Los estudios en animales permiten analizar la influencia de la maduración cerebral en la aparición de las crisis.[3]

Identificación de fármacos que eviten las consecuencias de las crisis

Se ha sugerido que las convulsiones pueden influir en la progresión de la epilepsia, su resistencia al tratamiento o las alteraciones en el comportamiento, el aprendizaje o la memoria, que a su vez influyan en el desarrollo psicomotor. Estos efectos de las crisis son controvertidos en los humanos por la dificultad de su estudio. Parece que no se producen en las epilepsias generalizadas idiopáticas y que pueden existir en las generalizadas sintomáticas. A pesar de ello, se maneja el concepto de encefalopatía epiléptica para indicar las alteraciones del comportamiento, la memoria y el aprendizaje producidas por la epilepsia.[9,13] En animales normales hay modelos, como el *kindling*, que demuestran que las convulsiones agravan la epilepsia, pueden afectar la memo-

ria y el aprendizaje, y producir alteraciones del comportamiento que semejan alteraciones psiquiátricas, lo cual abre la posibilidad de identificar fármacos que las eviten.[3] Sin embargo, estudios en animales epilépticos indican que los efectos de las convulsiones sobre un cerebro normal no son los mismos que sobre un cerebro epiléptico, lo que plantea la duda de cuáles de los efectos observados se deben a las crisis y cuáles a los cambios neuronales, de los canales iónicos y de los receptores que producen la epilepsia.[19]

Identificación de fármacos que finalicen las convulsiones

Con frecuencia, las crisis se autolimitan y acaban, pero en otras ocasiones producen un *status* epiléptico. Los mecanismos que abortan la crisis pueden ser múltiples y probablemente son diferentes en función del tipo de crisis. La epilepsia parcial continua, que puede durar de horas a años, pone de manifiesto que los mecanismos que terminan una crisis pueden ser diferentes de los que impiden su propagación.[3] Se necesitan también modelos que identifiquen fármacos que finalicen las crisis.

Interacciones de los antiepilépticos

Las interacciones de los antiepilépticos son frecuentes y clínicamente relevantes. Influyen en la respuesta al tratamiento y pueden ser beneficiosas, pero también perjudiciales. Con frecuencia obligan a modificar la dosis y, en algunos casos, debe evitarse la asociación debido a sus posibles efectos secundarios. Las interacciones pueden ser farmacocinéticas y farmacodinámicas.

Interacciones farmacocinéticas

Producen un aumento o una disminución de las concentraciones séricas de otros antiepilépticos y, como consecuencia, pueden modificar sus efectos.[20,21] Estas interacciones son variables y difíciles de predecir en su intensidad y dirección. Por ejemplo, la carbamacepina y el fenobarbital pueden aumentar y reducir las concentraciones de fenitoína. Sus efectos beneficiosos o perjudiciales dependen de las concentraciones que se estén manejando; por ejemplo, un aumento de concentración puede mejorar la eficacia si era baja y producir toxicidad si era alta. Las interacciones farmacocinéticas pueden controlarse monitorizando las concentraciones séricas de los antiepilépticos, y corregir su influencia ajustando las dosis. En la Tabla II se resumen las principales interacciones farmacocinéticas de los antiepilépticos descritas en los humanos.[22]

Interacciones farmacodinámicas

Las interacciones farmacodinámicas no modifican las concentraciones séricas sino la sensibilidad, y por tanto el efecto que produce una determinada concentración sérica. Se deben, en gran parte, a la suma de los efectos terapéuticos o tóxicos, relacionados con frecuencia con su mecanismo de acción.

Principales mecanismos de acción de los antiepilépticos

Los principales mecanismos de acción de los antiepilépticos son la inhibición de los canales de sodio y de los canales de calcio T del tálamo, la facilitación del tono $GABA_A$ y la inhibición del tono glutamérgico, pero también se han descrito otros mecanismos, como la activación de los canales de potasio, la inhibición de los receptores $GABA_B$ y la inhibición de los receptores glutamérgicos AMPA/KA. Más recientemente se ha descrito que algunos antiepilépticos desarrollados en función de un determinado mecanismo de acción (como la gabapentina o la pregabalina), o de forma empírica (como el levetiracetam), actuaban fijándose de forma específica a la subunidad $\alpha 2\delta$ de los canales P/Q de calcio o a las proteínas de las vesículas sinápticas SV2A, respectivamente, lo que podría inhibir la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutámico (Tabla III).[22-24]

TABLA II. Interacciones farmacocinéticas de los antiepilépticos en humanos.[22]

Fármaco añadido	*Efecto sobre el nivel estable del antiepiléptico basal*												
	CBZ	*ESM*	*PB*	*PHT*	*VPA*	*GBP*	*LEV*	*LTG*	*OHC*	*PGB*	*TGB*	*TPM*	*ZNS*
CBZ	–	↓↓	∅	↑↑,↓	↓↓	∅	↓	↓↓	↓	∅	↓↓	↓↓	↓↓
ESM	∅	–	∅	∅	↓	∅	∅	∅	∅	?	?	?	?
PB	↓↓	↓↓	–	↑,↓↓	↓↓	∅	↓	↓↓	↓	∅	↓↓	↓↓	↓↓
PHT	↓↓	↓↓	↑	–	↓↓	∅	↓	↓↓	↓	∅	↓↓	↓↓	↓↓
VPA	∅, ↑E	↓,↑	↑↑	∅, #	–	∅	∅	↑↑	∅	∅	∅,#	↓?	↓,#
GBP	∅	∅	∅	↑?	∅	–	∅	?	∅	?	?	∅	?
LEV	∅	∅	∅	↑?	∅	∅	–	∅	∅	?	?	?	?
LTG	∅,↑E?	∅	∅	∅	↓	∅	∅	–	∅	?	?	∅	∅
OXC	↓,↑E	∅	↑	↑↑	∅	?	↓	↓	–	?	?	↓	?
PGB	∅	¿?	∅	∅	∅					–	?	?	?
TGB	∅	∅	∅	∅	∅, ↓?	?	?	?	?	?	–	?	?
TPM	∅	¿?	∅	↑	∅ ,↓	?	∅	∅ ,↓?	∅	?	?	–	?
ZNS	∅ ,↓	¿?	∅	∅	∅	?	?	∅	?	?	?	?	–

CBZ: carbamacepina; ESM: etosuximida; GBP: gabapentina; LEV: levetiracetam; LTG: lamotrigina; OXC: oxcarbacepina; PB: fenobarbital; PGB: pregabalina; PHT: fenitoína; TGB: tiagabina; TPM: topiramato; VPA: valproato; ZNS: zonisamida. Una flecha indica cambios ligeros y dos flechas cambios importantes que requieren ajuste de la dosis o monitorización de las concentraciones séricas. ∅ = sin cambios. ↑E = aumenta la 10,11-epoxi-CBZ. # = aumentan la PHT y la TGB libre. ? = no hay datos o no son concluyentes.

Relación entre el mecanismo de acción y la eficacia

La relación entre los mecanismos de acción y la eficacia en diferentes tipos de crisis está mal definida. La inhibición de los canales de sodio se corresponde con la eficacia en las convulsiones tonicoclónicas generalizadas y en las crisis focales, y la inhibición del canal T de calcio en el tálamo con la eficacia frente a las ausencias. La correspondencia entre la facilitación gabérgica o la inhibición glutamérgica y la eficacia clínica es menos clara; de hecho, algunos fármacos gabérgicos, como la vigabatrina y la tiagabina, tienen un espectro reducido frente a las crisis focales, similar al de los inhibidores de los canales de sodio como la carbamacepina y la fenitoína, mientras que las benzodiacepinas tienen un espectro antiepiléptico mayor. Los fármacos antiglutamérgicos son poco eficaces en las crisis focales. El amplio espectro de algunos antiepilépticos, como el valproato, la lamotrigina, el topiramato y la zonisamida, puede deberse a que actúan por múltiples mecanismos (Tabla III).[22]

Asociaciones de mecanismos que pueden ser beneficiosas

La etiopatogenia de la epilepsia y el mecanismo de los antiepilépticos no se conocen

TABLA III. Mecanismo de acción de los antiepilépticos.[22]

	Primera generación						*Segunda generación*								
Mecanismo	*BZD*	*CBZ*	*ESM*	*PB*	*PHT*	*VPA*	*GBP*	*LEV*	*LTG*	*OXC*	*PGB*	*TGB*	*TPM*	*VGB*	*ZNS*
Inhibición de los canales de sodio	+*	++	±?	+*	++	+?	±?		++	++			+		+
Inhibición de los canales de calcio L		+											+		
Inhibición de los canales de calcio N y P/Q	+*			+*	+?		++	±?	+	+	++				+
Inhibición de los canales de calcio T talámicos			++			±?									++
Activación de los canales de potasio		±?	±?							+			+		
Inhibición de corrientes I_h							+		+						
Facilitación gabérgica															
Aumento de la síntesis						+	+								
Aumento de la liberación						+*	+								+?
Inhibición de la recaptación							+					++		+	
Inhibición de la GABA-transaminasa						+	+							++	
Agonismo receptor $GABA_A$	++			++	+?			±					+		
Agonismo receptor $GABA_B$							+							+?	
Inhibición glutamérgica															
Inhibición de la liberación		+		+	+?	+	+		+	+	+			+	+?
Antagonismo receptor NMDA								±?							
Antagonismo receptores AMPA				+											
Antagonismo receptores KA													+		
Inhibición de la liberación de aspártico						+									
Fijación a SV2A								++							
Inhibición de la anhidrasa carbónica													±		±

++ Efecto principal, + Efecto secundario, ± Efecto ligero, ? Efecto dudoso. *A altas concentraciones.

tan bien como para basar la asociación de antiepilépticos en su mecanismo de acción. No obstante, hay algunos datos que sugieren que se puede conseguir un beneficio mayor con la asociación de un inhibidor de los canales de sodio con un antiepiléptico con múltiples mecanismos de acción, o con un fármaco gabérgico, que asociando dos inhibidores de los canales de sodio.

Por ejemplo, en una revisión de 107 estudios de convulsiones en animales que incluían 536 interacciones, las asociaciones con mayores efectos sinérgicos en más experimentos fueron, por orden: múltiples mecanismos + múltiples mecanismos > gabérgico + gabérgico > inhibidor de canales de sodio + gabérgico > inhibidor de canales de sodio + múltiples mecanismos > dos inhibidores de canales de sodio.[25-27]

De igual forma, en una revisión de 39 estudios clínicos sobre asociaciones de antiepilépticos se concluyó que la asociación de un inhibidor de los canales de sodio con un fármaco con múltiples mecanismos de acción o con un fármaco gabérgico parecía más útil que la asociación de dos fármacos gabérgicos, y ésta más eficaz que la de dos inhibidores de los canales de sodio.[5,25]

Por otra parte, debe tenerse en cuenta la posibilidad de que los antiepilépticos tengan un efecto antagónico o una acción proconvulsionante que resulte perjudicial. Por ejemplo, las ausencias y las mioclonías son empeoradas por algunos inhibidores de los canales de sodio, como la carbamacepina, la oxcarbacepina y la fenitoína, y por algunos antiepilépticos que aumentan la concentración de GABA, como la gabapentina, la tiagabina y la vigabatrina, debido a que este GABA puede estimular receptores $GABA_B$ que aumentan la hiperpolarización de las neuronas del tálamo.[28] Por ello, se recomienda evitar estos fármacos en las epilepsias generalizadas idiopáticas y se prefiere asociar antiepilépticos con mecanismos múltiples.

Además, algunas asociaciones aumentan la eficacia, pero también la toxicidad. Por ejemplo, los inhibidores de los canales de sodio (como fenitoína, carbamacepina y lamotrigina) producen alteraciones neurológicas que son aditivas, y los fármacos gabérgicos (como benzodiacepinas y fenobarbital) producen efectos sedantes que también son aditivos. En estos casos, la toxicidad puede aumentar más que la eficacia o contrarrestar el beneficio de la mayor eficacia.

Asociaciones farmacodinámicas beneficiosas y perjudiciales

Se han sugerido diversas interacciones farmacodinámicas de antiepilépticos:[10,21,22,29]

1) Beneficiosas: mayor eficacia en crisis parciales de benzodiacepinas + fenobarbital + fenitoína, de carbamacepina + fenitoína + fenobarbital, de carbamacepina + valproato, de lamotrigina + valproato, de carbamacepina + vigabatrina y de valproato + vigabatrina; y mayor eficacia antiausencias de valproato + etosuximida, de valproato + clonazepam y de valproato + lamotrigina.
2) Perjudiciales: en general, la frecuencia de reacciones adversas es mayor cuando los antiepilépticos se utilizan en politerapia que en monoterapia. En concreto, la somnolencia es más frecuente cuando se asocian antiepilépticos sedantes, como el fenobarbital y la primidona, con benzodiacepinas, y la toxicidad neurológica es más frecuente al asociar fenitoína, lamotrigina o levetiracetam con carbamacepina y en ocasiones con oxcarbacepina. Otras posibles interacciones son el riesgo de *status* al asociar valproato con clonazepam, de exantemas y temblor al asociar valproato con lamotrigina, y de encefalopatía al asociar valproato con fenobarbital. También puede aumentar la frecuencia de reacciones adversas idiosincráticas; por ejemplo, la hepatotoxicidad del valproato en niños menores de 2 años es menor en monoterapia que en asociación con inductores. Además, pueden producirse reacciones adversas diferentes; por ejemplo, se han descrito tres casos de corea en pacientes con fenitoína + lamotrigina, que desapareció al suprimir cualquiera de los dos.

Problemas del estudio de las interacciones farmacodinámicas

La interacción farmacodinámica puede ser aditiva (equivalente a la suma de los efectos de los dos fármacos en monoterapia), supraaditiva o sinérgica (mayor que la suma de los dos), infraaditiva o antagónica (menor que la suma de los dos) o indiferente, tanto para la eficacia antiepiléptica como para la neurotoxicidad.

A su vez, la interacción puede ser beneficiosa cuando la eficacia aumenta más que la toxicidad, neutra cuando aumentan tanto la eficacia como la toxicidad, y perjudicial si la eficacia aumenta menos que la toxicidad.

Los estudios sobre las interacciones farmacodinámicas de los antiepilépticos deben tener varios objetivos, que no siempre es posible conseguir:[4,30]

- Demostrar que la interacción es sinérgica, aditiva, antagónica o indiferente. Se puede valorar con métodos isobológráficos, la fracción de la dosis eficaz o la influencia de una dosis baja de un antiepiléptico sobre la curva dosis-efecto de otro.
- Demostrar que la asociación de antiepilépticos es beneficiosa, neutra o perjudicial. Para ello debe analizarse simultáneamente el efecto sobre la eficacia y sobre la toxicidad, y demostrar que el aumento de la eficacia es mayor que el de la toxicidad, es decir, que el índice terapéutico de la asociación es mayor que los índices terapéuticos en monoterapia.
- Demostrar que el efecto observado no puede atribuirse a una interacción farmacocinética, valorando si existen interacciones farmacocinéticas que lo justifiquen. Para descartar las interacciones farmacocinéticas se pueden determinar las concentraciones séricas, o preferiblemente las concentraciones cerebrales, y expresar los resultados farmacodinámicos como curva concentración cerebral-efecto en lugar de como curva dosis-efecto.

Estudios clínicos

La mayor parte de los estudios clínicos sobre asociaciones de antiepilépticos presentan problemas metodológicos que dificultan la interpretación de sus resultados. En la práctica clínica es muy difícil realizar estudios isobológráficos para asegurar que la interacción es supraaditiva, aditiva o infraaditiva, y no se pueden determinar las concentraciones cerebrales para descartar una interacción farmacocinética. En todo caso, lo importante en la clínica es demostrar que una asociación de dos antiepilépticos es beneficiosa, es decir, que aumenta la eficacia sin aumentar la toxicidad, o reduciéndola, respecto a ambos antiepilépticos en monoterapia, y que este efecto no es atribuible a un aumento de las concentraciones séricas que se hubiera podido conseguir incrementando la dosis. Por ello, aunque la variable principal sea la mejoría de la eficacia, debe demostrarse también que no hay un aumento de la toxicidad y que no hay un aumento de las concentraciones séricas que explique la mayor eficacia.[4,6,30,31]

El ensayo ideal consistiría en administrar, de forma aleatorizada, a pacientes tratados con un antiepiléptico A que no interactúe con los antiepilépticos B y C a estudiar, el antiepiléptico B, el antiepiléptico C o la asociación B+C. También se consideran óptimos los ensayos en pacientes resistentes al tratamiento sucesivo con dos antiepilépticos en monoterapia a las máximas dosis toleradas (es decir, justo por debajo de la dosis que produce efectos adversos persistentes), en los que se prueba la asociación de ambos antiepilépticos.[29,30]

Estudios en animales

Hay seis antiepilépticos de primera generación y once de segunda generación (Tablas II y III), por lo que el número de biterapias posibles es muy alto y puede seguir creciendo cuando se comercialicen los nuevos antiepilépticos en desarrollo. Los estudios en animales pueden dar una orientación sobre las asociaciones que deberían estudiarse en ensayos clínicos. En todo caso, en las revisiones de los estudios de asociaciones en animales y humanos puede verse que aunque los efectos de algunas asociaciones coinciden, por ejem-

plo el efecto beneficioso de la asociación de lamotrigina y valproato, en otros casos no es así.[4,25,26,32] Debe tenerse en cuenta que los animales tienen características farmacocinéticas diferentes, que los modelos de convulsiones no siempre reflejan los efectos en las epilepsias humanas y que la mayor parte de los estudios en animales son agudos, mientras que los tratamientos en la epilepsia humana son crónicos, con la posibilidad de que se produzcan efectos inductores o inhibidores sobre enzimas y transportadores. Por ello, los datos obtenidos en animales deben analizarse con precaución y confirmarse en humanos.

Método isobológico

Para valorar las interacciones farmacodinámicas se pueden utilizar diferentes procedimientos.[30] El método que mejor objetiva si una interacción es supraaditiva, aditiva o infraaditiva es el isobológico (Fig. 2).[6,26,30,32] Este método puede aplicarse también para valorar un conjunto de datos individuales y la DE_{50} de las monoterapias y de la combinación, siempre que en las dosis crecientes de los dos fármacos se mantenga una proporción constante. El método isobológico se ha utilizado especialmente para valorar la eficacia, pero por sí mismo no valora el efecto sobre el índice terapéutico ni, por tanto, si la interacción es beneficiosa o perjudicial. Sería erróneo concluir que una asociación puede ser beneficiosa porque sea supraaditiva para la eficacia. Se debe estudiar por separado la interacción sobre la eficacia y sobre la toxicidad, considerando que la interacción es beneficiosa cuando es supraaditiva sobre la eficacia y

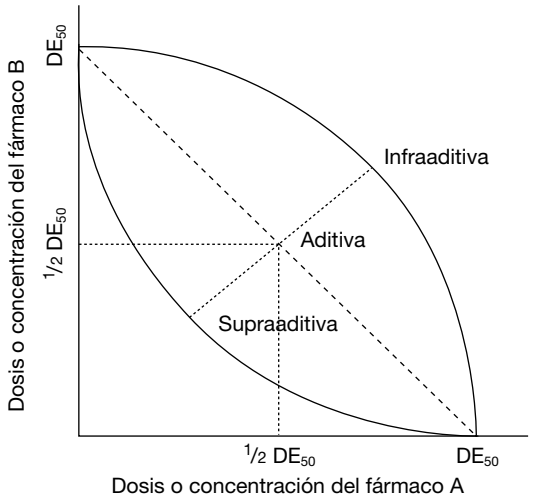


Figura 2. Método isobológico. Interacción aditiva: si se representa en abscisas la dosis del fármaco A que produce un determinado efecto (por ejemplo, la DE_{50} que produce la mitad del efecto máximo) y en ordenadas la dosis del fármaco B que produce ese mismo efecto y se unen con una línea, el efecto que producirán ½ DE_{50} de A + ½ DE_{50} de B (o ¼ de A + ¾ de B) quedará en dicha línea. Cuando la interacción es supraaditiva o sinérgica bastará una dosis total menor (por ejemplo, ¼ de la DE_{50} de A + ¼ de la DE_{50} de B) para producir el mismo efecto, por lo que la DE_{50} de la asociación A+B a una determinada proporción (por ejemplo de 1:1) quedará por debajo de la línea aditiva. Cuando la interacción es infraaditiva o antagónica se necesitará una dosis total mayor (por ejemplo, ¾ de la DE_{50} de A + ¾ de la DE_{50} de B) para conseguir el mismo efecto, por lo que la DE_{50} de la asociación A+B a una determinada proporción (por ejemplo de 1:1) quedará por encima de la línea aditiva.

aditiva o infraaditiva sobre la toxicidad. Por este procedimiento se ha demostrado en animales que son beneficiosas las asociaciones de lamotrigina + topiramato,[32] de gabapentina + oxcarbacepina[33] y de levetiracetam + carbamacepina, oxcarbacepina o topiramato.[34]

Método de la fracción de la dosis eficaz 50

La fracción de la dosis eficaz 50 (FDE) es la suma del cociente de la dosis eficaz 50 del fármaco A en asociación ($DE_{50}(A+B)$) y en monoterapia ($DE_{50}A$) y del cociente de la dosis eficaz 50 del fármaco B en asociación ($DE_{50}(B+A)$) y en monoterapia ($DE_{50}B$):

$$FDE = \frac{DE_{50}(A+B)}{DE_{50}A} + \frac{DE_{50}(B+A)}{DE_{50}B}$$

En este método se considera que una FDE entre 0,7 y 1,3 es aditiva, una FDE menor de 0,7 es supraaditiva o sinérgica, y una FDE mayor de 1,3 es infraaditiva o antagónica.[35] Igual que en el método isobológrafico, la FDE no valora los efectos sobre el índice terapéutico. Para saber si una interacción es beneficiosa o perjudicial se debe estudiar la interacción sobre la eficacia y sobre la toxicidad, considerando que la interacción es beneficiosa cuando es supraaditiva sobre la eficacia y aditiva o infraaditiva sobre la toxicidad. De esta forma se ha concluido que pueden ser beneficiosas las asociaciones de valproato + etosuximida y de valproato + carbamacepina o fenitoína, porque la eficacia aumenta más que la toxicidad, y que no tiene ventaja la asociación de fenobarbital con valproato o carbamacepina porque la eficacia aumenta menos que la toxicidad. En la asociación de fenobarbital y fenitoína la eficacia aumenta aditivamente y la toxicidad infraaditivamente, pero el índice terapéutico de la fenitoína en monoterapia es mayor que el de la asociación.[4,25]

Influencia de una dosis baja sobre la curva dosis-efecto

Un tercer procedimiento consiste en administrar el fármaco A en presencia de una dosis baja (que no llega a producir ningún efecto) del fármaco B y comparar la DE_{50} del fármaco A en monoterapia y en asociación. Esto se puede hacer bidireccionalmente (influencia de A sobre B y de B sobre A), y tanto sobre la eficacia como sobre la toxicidad, para valorar la influencia de la interacción sobre el índice terapéutico.[30] De esta forma se ha descrito que son beneficiosas la asociación de felbamato con fenitoína, valproato, carbamacepina o fenobarbital,[3] y la asociación de valproato + lamotrigina,[36] lamotrigina + felbamato,[37] valproato + felbamato[38] y valproato + vigabatrina.[39]

La disminución de la DE_{50} en este modelo indicaría un efecto supraaditivo, ya que la suma de 0 y un número no debería ser mayor que ese número. Sin embargo, dado que la curva dosis-efecto es sigmoide, es posible que la suma de 10 mg/kg y 50 mg/kg produzca el efecto de 60 mg/kg incluso cuando 10 mg/kg no produzcan efecto. Por ello, es posible que el efecto sea meramente aditivo. Independientemente de que este modelo demuestre o no que un efecto es aditivo o supraaditivo, resulta especialmente útil desde el punto de vista clínico, porque permite valorar el efecto sobre el índice terapéutico y, por tanto, si una interacción puede ser beneficiosa o perjudicial.[30]

Valoración de las posibles interacciones farmacocinéticas

Para descartar las interacciones farmacocinéticas se pueden utilizar diferentes procedimientos. Como primera aproximación se pueden determinar las concentraciones séricas o cerebrales de los antiepilépticos implicados para ver si la asociación de un antiepiléptico modifica las concentraciones del otro. Si hay una interacción farmacocinética se pueden expresar los resultados como curvas de concentración cerebral-efecto en lugar de como curvas dosis-efecto. Por ejemplo, en un estudio isobológrafico de la interacción de la asociación fenitoína + fenobarbital se demostró un efecto supraaditivo, pero puesto que el fenobarbital aumentaba

las concentraciones cerebrales de la fenitoína, el estudio de las curvas de concentración cerebral-efecto en lugar del de las curvas dosis-efecto indicó que la interacción era solamente aditiva.[30]

Un estudio de interacciones farmacodinámicas

Objetivo

Identificar en el ratón asociaciones de antiepilépticos con un perfil favorable, es decir, que mejoren la eficacia más que la toxicidad, como referencia inicial para el estudio de posibles asociaciones en ensayos clínicos.

Métodos

Se han estudiado las interacciones dos a dos de un antiepiléptico de primera generación de amplio espectro (valproato), dos antiepilépticos de segunda generación de amplio espectro (felbamato y lamotrigina) y dos antiepilépticos de segunda generación de espectro reducido (gabapentina y vigabatrina).

El estudio se realizó en ratones CD-1 (Charles-River), machos, adultos, de 20 a 28 gramos, estabulados al menos siete días antes de su utilización en condiciones ambientales de luz-oscuridad y una temperatura de 19 a 24 ºC, con agua y comida *ad libitum*, en grupos de 25 ratones por caja.

En primer lugar se estudió, en grupos de al menos ocho ratones, la influencia de asociar una dosis baja e ineficaz de un antiepiléptico sobre el efecto anticonvulsionante de dosis crecientes de un segundo antiepiléptico en tres modelos de convulsiones agudas (Tabla IV):

- 4-aminopiridina: bloqueante de los canales de potasio dependientes del voltaje que produce efectos similares a los del electrochoque máximo. El efecto sobre la extensión tónica de las patas posteriores refleja la eficacia frente a las convulsiones tonico-clónicas generalizadas.
- Pentilentetrazol: bloquea el canal de cloro del receptor $GABA_A$. El efecto sobre el *clonus* refleja el efecto antimioclónico.
- Picrotoxina: bloqueante del canal de cloro del receptor $GABA_A$. Se considera un modelo de convulsión antigabérgica.

En las asociaciones en que se observó un aumento significativo de la potencia anticonvulsionante respecto a la monoterapia se estudió, en grupos diferentes de ratones, la neurotoxicidad mediante el test del rotarod, expresada como la incapacidad de mantener el equilibrio durante un minuto en tres intentos en un rotarod de 3 cm a 6 rpm.

También se determinaron las concentraciones de los antiepilépticos en cerebro total (para descartar que las interacciones tuvieran un origen farmacocinético) y las concentraciones de GABA y glutámico en cerebro total (para analizar su relación con los efectos anticonvulsionantes). Las concentraciones de los antiepilépticos en cerebro total se determinaron mediante inmunoanálisis de fluorescencia polarizada (valproato) o mediante cromatografía líquida (felbamato, lamotrigina y vigabatrina). Las concentraciones de GABA

TABLA IV. Características de los modelos de convulsiones agudas utilizados.

Modelo	*DE_{97} (mg/kg)*	*Vía de administración*	*Parámetro convulsivo*	*Periodo de observación*
4-aminopiridina	14	s.c.	Extensión tónica de miembros posteriores	30 min
Pentilentetrazol	110	s.c.	*Clonus* de 5 segundos	30 min
Picrotoxina	4,5	s.c.	*Clonus* de 5 segundos	60 min

TABLA V. Características de los antiepilépticos utilizados.

Antiepiléptico	*Vía de administración*	*Dosis anticonvulsionante (mg/kg)*	*Dosis neurotóxica (mg/kg)*	*Tiempo de máximo efecto*
Felbamato	p.o.	12,5 a 600	160 a 2000	120 min
Gabapentina	p.o./i.p.	50 a 1000	500 a 1000	90 min
Lamotrigina	p.o.	1,5 a 65	20 a 80	60 min
Valproato	i.p.	75 a 450	225 a 600	20 min
Vigabatrina	i.p.	50 a 2000	1000 a 3000	240 min

y glutámico en cerebro total se determinaron mediante cromatografía líquida.

El estudio de la eficacia anticonvulsionante, de la neurotoxicidad y de las concentraciones cerebrales se hizo de 9 a 14 horas y en el tiempo de máximo efecto de cada antiepiléptico. La vía, el intervalo de dosis anticonvulsionantes y neurotóxicas, y el tiempo de máximo efecto, se indican en la Tabla V.

La administración del convulsionante se hizo por vía subcutánea y la de los antiepilépticos por vía oral o intraperitoneal, todos en volúmenes de aproximadamente 0,01 ml por gramo de peso.

La DE_{50}, la DT_{50}, la potencia relativa (DE_{50} en monoterapia/DE_{50} en asociación) y su significación se calcularon mediante el método de Litchfield-Wilcoxon. Tras calcular el índice terapéutico (DT_{50}/DE_{50}) y el cociente terapéutico (índice terapéutico en asociación/índice terapéutico en monoterapia) se consideraron beneficiosas las asociaciones cuyo cociente terapéutico fue mayor de uno y perjudiciales aquellas en que este cociente fue menor de uno.

Resultados

En la Tabla VI se indican los efectos de cada antiepiléptico en monoterapia en los diferentes modelos de convulsiones y en el rotarod. En los casos en que se observó un efecto sigmoide completo se indica la DE_{50} o la DT_{50}. En los casos en que se observó un efecto parcial se indica el efecto máximo parcial. Los modelos seleccionados fueron más adecuados para valorar los efectos del valproato, el felbamato y la lamotrigina que los de la gabapentina y la vigabatrina.

En la Tabla VII se indican la DE_{50} y la DT_{50} del felbamato, la lamotrigina y el valproato en monoterapia y en asociación con una dosis baja de los otros antiepilépticos, así como su significación. También se indican los cambios producidos en las concentraciones cerebrales del antiepiléptico, del GABA y del glutámico expresadas como intervalo de cambio observado para las tres dosis estudiadas y su significación. En la Fig. 3 puede verse como ejemplo la

TABLA VI. Efectos de cada antiepiléptico en monoterapia en cada modelo.

	DE_{50} (mg/kg)			*DT_{50} (mg/kg)*
	4-aminopiridina	*Pentilentetrazol*	*Picrotoxina*	*Rotarod*
Felbamato	96	73	Parcial (30%)	1150
Gabapentina	Parcial (20%)	Parcial (42%)	288	Sin efecto
Lamotrigina	12	Sin efecto	—	54
Valproato	340	207	283	395
Vigabatrina	No	Parcial (29%)	Parcial (60%)	1670

influencia de una dosis baja de lamotrigina sobre los efectos y las concentraciones cerebrales del valproato. En la Tabla VIII se presentan como ejemplo las DE_{50} y las DT_{50}, las potencias relativas y su significación, los índices terapéuticos y los cocientes terapéuticos, de la asociación de una dosis baja de lamotrigina con dosis crecientes de valproato y de una dosis baja de valproato con dosis crecientes de lamotrigina.

En la Tabla IX se muestran las asociaciones beneficiosas y perjudiciales observadas, especificando el índice terapéutico en monoterapia

TABLA VII. Influencia de la asociación de una dosis baja de otros antiepilépticos sobre la dosis eficaz 50 (4-aminopiridina, pentilentetrazol o picrotoxina) o la dosis tóxica 50 (rotarod) de cada antiepiléptico.

Felbamato	*Monoterapia*	*+ Gabapentina*	*+ Lamotrigina*	*+ Vigabatrina*	*+ Valproato*
4-aminopiridina	96	64	53[a]	118	50[a]
Pentilentetrazol	100	29	91	—	67
Rotarod	1150	538	908	—	348[a]
Concentración cerebral	—	–16[a] a +17%	–37[a] a –10%	—	–15[a] a +6%
Concentración de GABA		–4 a +3%	–2 a +34%[b]		+19[b] a +65%[b]
Concentración de glutámico		–8[a] a +1%	–3 a +25%[b]		–4 a +26%[b]
Lamotrigina	*Monoterapia*	*+ Felbamato*	*+ Gabapentina*	*+ Vigabatrina*	*+ Valproato*
4-aminopiridina	12,3	2,8[a]	—	13,9	6,3[a]
Rotarod	54,1	44,3	—	—	43,7
Concentración cerebral	—	–12 a +6%	—	–35[b] a –29%[b]	+7 a +35%[b]
Concentración de GABA		–33[b] a +51%[b]	—	+223[b] a +365%[b]	–8 a +76%[b]
Concentración de glutámico		–9[b] a +23%[b]	—	–22[b] a –15%	+2 a +14%[b]
Valproato	*Monoterapia*	*+ Felbamato*	*+ Gabapentina*	*+ Lamotrigina*	*+ Vigabatrina*
4-aminopiridina	350	218[a]	—	174[a]	—
Pentilentetrazol	205	211	—	110[a]	126[a]
Picrotoxina	282	—	—	—	262
Rotarod	395	357	—	416	423
Concentración cerebral	—	–4 a +2%	—	–11 a +5%	–11 a +2%
Concentración de GABA	—	–8[b] a +34%[b]	—	+21[b] a +39%[b]	+48[b] a +72%[b]
Concentración de glutámico	—	–7[b] a +12%	—	–5 a +7%	–13[b] a +2%

[a]Cambio de la DE_{50} estadísticamente significativo por el método de Litchfield y Wilcoxon.
[b]Cambios en la concentración cerebral estadísticamente significativos.

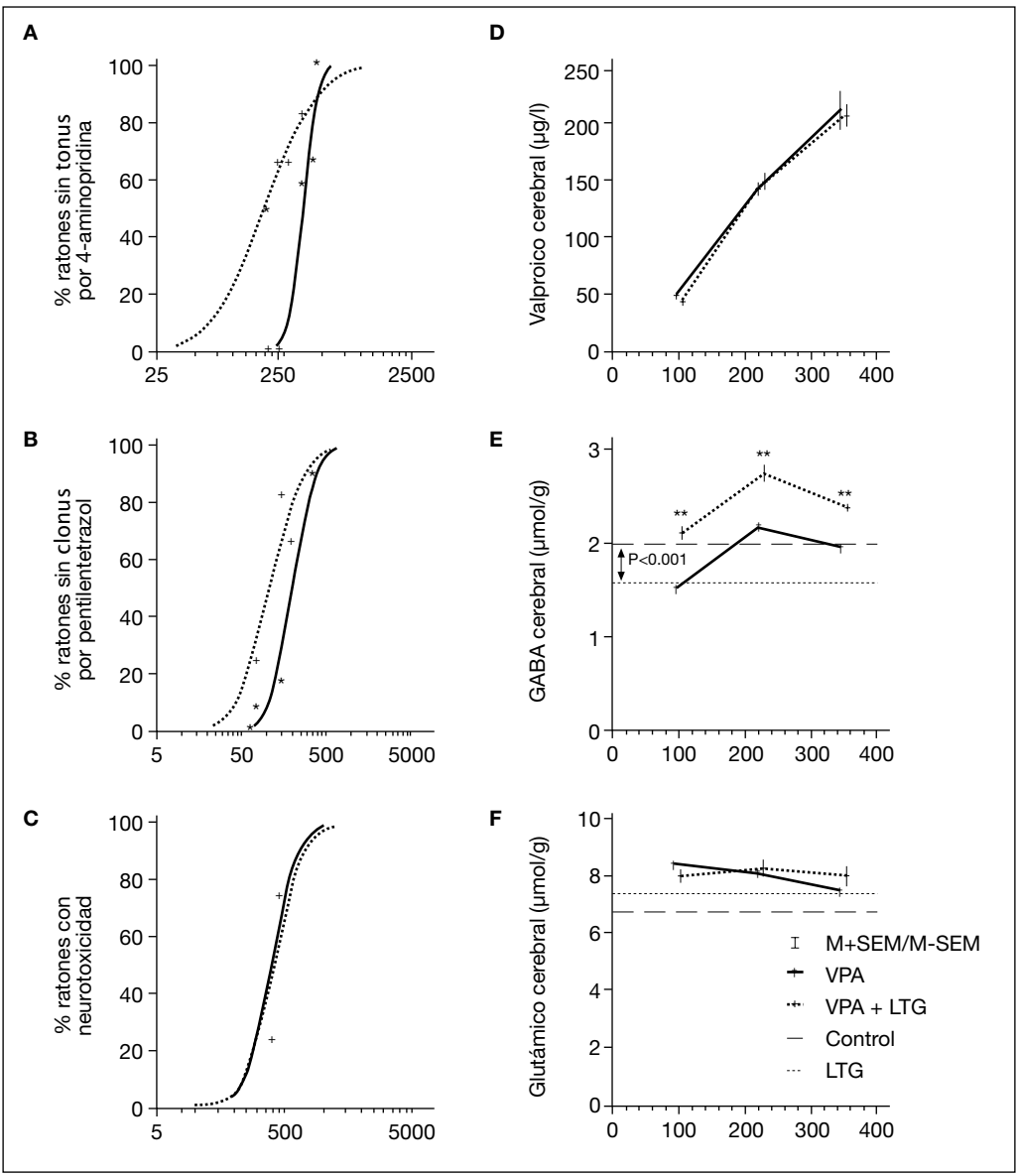


Figura 3. A la izquierda: curvas dosis-efecto del ácido valproico en el tonus *por 4-aminopiridina (A) y en el* clonus *por pentilentetrazol (B), y curva dosis-neurotoxicidad en el rotarod (C) tras dosis únicas crecientes de valproato en monoterapia (VPA en trazo continuo) y en asociación con una dosis baja de lamotrigina (LTG) de 5 mg/kg en el modelo de la 4-aminopiridina, y de 1,5 mg/kg en el modelo del pentilentetrazol (VPA + LTG en trazo discontinuo). A la derecha: influencia de asociar 5 mg/kg de lamotrigina a dosis únicas crecientes de valproato sobre la concentración de valproico (D), de GABA (E) y de glutámico (F) en cerebro total. Los efectos se estudiaron en ratones CD1 en el tiempo de máximo efecto (a los 20 minutos de la administración intraperitoneal del valproato). **p <0.01 frente a la misma dosis en monoterapia. Los datos son la media ± el error estándar de la media. p: significación entre el control y la dosis baja de lamotrigina.*[36]

y en asociación, el cociente terapéutico y el efecto sobre las concentraciones cerebrales del antiepiléptico. Se identificaron nueve asociaciones beneficiosas (cinco en el modelo de la 4-aminopiridina, tres en el del pentilentetrazol y una en el de la picrotoxina) y cinco perjudiciales (dos en el modelo de la 4-aminopiridina y tres en el del pentilentetrazol). La mayor parte de las asociaciones beneficiosas se observaron con el valproato, seguido de la lamotrigina y el felbamato.

Ninguna de las asociaciones beneficiosas se explicó por interacciones farmacocinéticas. La gabapentina, la lamotrigina y el valproato redujeron las concentraciones cerebrales del felbamato, y la vigabatrina redujo las de la lamotrigina, lo que refuerza la naturaleza farmacodinámica de las interacciones. El felbamato y el valproato aumentaron puntualmente las concentraciones cerebrales de lamotrigina, por lo que no puede descartarse que parte del aumento en los efectos de la lamotrigina se haya debido a un aumento de sus concentraciones cerebrales (Tabla VII).

Respecto a los cambios neuroquímicos, se observó un aumento del GABA cerebral al añadir valproato al felbamato, al añadir vigabatrina a la lamotrigina y al añadir lamotrigina y vigabatrina al valproato, lo que podría explicar al menos en parte la potenciación del efecto anticonvulsionante. En algunos casos se vio una disminución de las concentraciones de glutámico, pero no fueron consistentes (Tabla VII).

Conclusiones

- Ha sido más frecuente que aumenten los efectos anticonvulsionantes que los neurotóxicos, por lo que también ha sido más frecuente observar asociaciones potencialmente beneficiosas que perjudiciales.
- Nuestro estudio ha identificado nueve asociaciones de antiepilépticos en las cuales una dosis baja de un antiepiléptico aumenta el índice terapéutico de otro, cinco en el modelo de la 4-aminopiridina, tres en el modelo del pentilentetrazol y una en el modelo de la picrotoxina.

TABLA VIII. Influencia de una dosis baja de lamotrigina sobre los efectos anticonvulsionantes y neurotóxicos de dosis únicas crecientes de valproato, y viceversa, en ratones CD1.[36]

	DE_{50} (mg/kg)		DT_{50} (mg/kg)	IT (DT_{50}/DE_{50})	
Grupos	*4-AP*	*PTZ*	*Rotarod*	*4-AP*	*PTZ*
A) Influencia de una dosis baja de lamotrigina sobre dosis crecientes de valproico					
VPA	350 (318-384)	205 (171-244)	395 (329-474)	1,1	1,9
VPA + LTG	174 (128-237)	110 (78-154)	416 (329-525)	2,4	3,8
PR [VPA/(VPA+LTG)]	2,0 (1,5-2,8)[a]	1,9 (1,3-2,7)[a]	1,0 (0,7-1,3)		
CT [(VPA+LTG)/VPA]				2,2	2,0
B) Influencia de una dosis baja de valproico sobre dosis crecientes de lamotrigina					
LTG	12 (10-16)	—	54 (43-68)	4,4	—
LTG + VPA	6 (4-9)	—	44 (40-48)	7,3	—
PR [LTG/(LTG+VPA)]	2,1 (1,3-3,4)[a]		1,2 (1,0-1,6)		
CT [(LTG+VPA/LTG]				1,7	—

4-AP: 4-aminopiridina; CT: cociente terapéutico o cociente del índice terapéutico en asociación dividido por el índice terapéutico en monoterapia; LTG: lamotrigina; IT: índice terapéutico; PR: potencia relativa; PTZ: pentilentetrazol; VPA: valproato. Los datos son la mediana y el intervalo de confianza del 95%. [a]$p < 0.05$ por el método de Litchfield y Wilcoxon.

TABLA IX. Efectos de las asociaciones de antiepilépticos sobre el índice terapéutico y las concentraciones cerebrales.

Antiepiléptico				*Cociente terapéutico (asociación/ monoterapia)*	*Concentraciones cerebrales del antiepiléptico a dosis crecientes*
A dosis crecientes	*A dosis baja*	*Índice terapéutico en monoterapia*	*Índice terapéutico en asociación*		
1) ASOCIACIONES EN LAS QUE AUMENTA EL ÍNDICE TERAPÉUTICO					
a) En el modelo de la 4-aminopiridina:					
Felbamato + Lamotrigina[b]		12,0	17,1	1,4	D
Lamotrigina + Felbamato[b]		4,4	15,7	3,6	SCS
Lamotrigina + Valproato[a]		4,4	7,3	1,7	A?
Valproato + Felbamato[c]		1,1	1,6	1,5	SCS
Valproato + Lamotrigina[a]		1,1	2,4	2,2	SCS
b) En el modelo del pentilentetrazol:					
Felbamato + Gabapentina		11,5	18,4	1,6	D?
Valproato + Lamotrigina[a]		1,9	3,8	2,0	SCS
Valproato + Vigabatrina[d]		1,9	3,2	1,7	SCS
c) En el modelo de la picrotoxina:					
Valproato + Vigabatrina[d]		1,4	1,6	1,1	SCS
2) ASOCIACIONES EN LAS QUE DISMINUYE EL ÍNDICE TERAPÉUTICO					
a) En el modelo de la 4-aminopiridina:					
Felbamato + Gabapentina		12,0	8,3	0,69	D?
Felbamato + Valproato[c]		12,0	7,0	0,81	D?
b) En el modelo del pentilentetrazol:					
Felbamato + Lamotrigina[b]		11,5	10,0	0,87	D
Felbamato + Valproato[c]		11,5	5,2	0,45	D?
Valproato + Felbamato[c]		1,9	1,7	0,89	SCS

A: aumenta; D: disminuye; SCS: sin cambios significativos; ? cambios significativos a unas concentraciones pero no a otras (ver Tabla VII). [a]Ref. 36. [b]Ref. 37. [c]Ref.38. [d]Ref.39.

– Las asociaciones beneficiosas se observaron más con los antiepilépticos de amplio espectro (valproato, lamotrigina y felbamato) que con los de espectro reducido (gabapentina y vigabatrina).

Nuestros resultados sugieren que los antiepilépticos de amplio espectro, como el valproato y la lamotrigina (y el felbamato si se desarrollan derivados sin toxicidad), pueden ser más adecuados para utilizar en asociación que los de espectro reducido, y que el modelo de la 4-aminopiridina parece adecuado para detectar asociaciones beneficiosas.

Agradecimientos

Los autores agradecen la beca concedida por la Fundación Marcelino Botín y las ayudas de in-

vestigación concedidas por la Dirección General de Enseñanza Superior (PM96-0037), la Fundación Pública Marqués de Valdecilla y la Comisión Mixta Universidad de Cantabria-Caja Cantabria, que hicieron posible la realización de este estudio de investigación que fue la Tesis Doctoral del Dr. Antonio Cuadrado, así como la colaboración de Dña. Águeda García, D. José Mª Sánchez, D. José Ramón Gaute, Dra. Isabel de las Cuevas, Dra. Elsa Valdizán, Dr. Jesús Bravo, Dr. Gaspar Amat y Dr. Javier Adín, en diversas fases del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sander JW. The problem of the drug –resistant epilepsies. Novartis Found Symp. 2002;243:4-12.
2. Arroyo S, Brodie MJ, Avanzini G, Baumgartner C, Chiron C, Dulac O, et al. Is refractory epilepsy preventable? Epilepsia. 2002;43:437-44.
3. Engel J, Schwartzkroin PA. What should be modeled? En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL, editores. Models of seizures and epilepsy. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 1-14.
4. Armijo JA, Herranz JL. Politerapia racional en epilepsia. I. Conceptos y fundamentos. Rev Neurol (Barc). 2007;45:95-109.
5. Mattson RH. Combination therapy with antiepileptic drugs: potential advantages and problems. En: Majkowski J, Bourgeois B, Patsalos P, Mattson R, editores. Antiepileptic drugs: combination therapy and interactions. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 16-25.
6. Kwan P, Brodie MJ. Combination therapy in epilepsy: when and what to use. Drugs. 2006;66:1817-29.
7. Armijo JA, Shushtarian M, Valdizan EM, Cuadrado A, De las Cuevas I, Adín J. Ion channels and epilepsy. Current Pharmaceutical Design. 2005;11:1975-2003.
8. Armijo JA, Adin J, Sánchez MB. Mecanismo de acción de los antiepilépticos y nuevos antiepilépticos. Rev Neurol. 2006;43(Suppl 1): S17-41.
9. Sutula T, Pitkanen A. Do seizures damage the brain? Progress in brain research, vol. 135. Amsterdam: Elsevier; 2002.
10. Majkowski J. Selection of drug combinations in clinical practice: current and future perspectives. En: Majkowski J, Bourgeois B, Patsalos P, Mattson R, editores. Antiepileptic drugs: combination therapy and interactions. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 421-40.
11. Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. Brain. 2006;129:18-35.
12. Engel J, Dichter MA, Schwartzkroin PA. Basic mechanisms of human epilepsy. En: Engel J, Pedley TA, editores. Epilepsy: a comprehensive textbook, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2008. p. 495-507.
13. Engel J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology. Epilepsia. 2001;42:796-803.
14. Lehnertz K, Litt B. The first international collaborative workshop on seizure prediction. Clin Neurophysiol. 2005;116:493-505.
15. White SH. Antiepileptic drug discovery. En: Shorvon SD, Perucca E, Fish DR, Dodson WE, editores. The treatment of epilepsy, 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific; 2004. p. 89-95.
16. White HS, Smith-Yockman M, Srivastava A, Wilcox KS. Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL, editores. Models of seizures and epilepsy. Elsevier: Amsterdam; 2006. p. 539-49.
17. Loscher W. Animal models of drug-refractory epilepsy. En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL, editores. Models of seizures and epilepsy. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 551-67.
18. Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs: a comparison of the pharmacology of kindling and post status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 2002;50:105-23.
19. Parent JM, Coulter DA, Bertram EH. The effects of seizures on the brain. En: Engel J, Pedley TA, editores. Epilepsy: a comprehensive textbook, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2008. p. 481-94.
20. Fischer JH. Drug interactions with antiepileptic agents. CNS News. 2004;6:85-95.
21. Rambeck B, May TW. Interactions between antiepileptic drugs. En: Majkowski J, Bourgeois B, Patsalos P, Mattson R, editores. Antiepileptic drugs: combination therapy and interactions. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 111-38.

22. Armijo JA, Herranz JL. Politerapia racional en epilepsia. II. Aspectos clínicos y farmacológicos. Rev Neurol (Barc). 2007;45:163-73.
23. Rogawski MA, Loscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. Neuroscience. 2004;5:553-64.
24. Loscher W, Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: innovative strategies. Epilepsy Res. 2006;69:183-272.
25. Deckers CL, Czuczwar SJ, Hekster YA, Keyser A, Kubova H, Meinardi H, et al. Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: the evidence reviewed. Epilepsia. 2000;41:1364-74.
26. Czuczwar SJ. Experimental studies of pharmacodynamic interactions. En: Majkowski J, Bourgeois B, Patsalos P, Mattson R, editores. Antiepileptic drugs: combination therapy and interactions. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 208-26.
27. Jonker DM, Voskuyl RA, Danhof M. Synergistic combinations of anticonvulsant agents: what is the evidence from animal experiments? Epilepsia. 2007;48:413-34.
28. Sazgar M, Bourgeois BF. Aggravation of epilepsy by antiepileptic drugs. Pediatr Neurol. 2005;33:227-34.
29. Pollard JR, French J. Clinical studies of pharmacodynamic interactions. En: Majkowski J, Bourgeois B, Patsalos P, Mattson R, editores. Antiepileptic drugs: combination therapy and interactions. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 228-40.
30. Bourgeois BFD. Methods for assessing pharmacodynamic interactions. En: Majkowski J, Bourgeois B, Patsalos P, Mattson R, editores. Antiepileptic drugs: combination therapy and interactions. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 193-207.
31. Bourgeois BFD. Pharmacodynamic principles and mechanisms of drug interactions. En: Majkowski J, Bourgeois B, Patsalos P, Mattson R, editores. Antiepileptic drugs: combination therapy and interactions. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 181-92.
32. Czuczwar SJ, Borowicz KK. Polytherapy in epilepsy: the experimental evidence. Epilepsy Res. 2002;52:15-23.
33. Luszczki JJ, Czuczwar SJ. Isobolographic characterisation of interactions among selected newer antiepileptic drugs in the mouse pentylentetrazole-induced seizure model. Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol. 2005;372:41-54.
34. Luszczki JJ, Andres MM, Czuczwar P, Cioczek-Czuczwar A, Ratnaraj N, Patsalos PN, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic characterization of interactions between levetiracetam and numerous antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock seizure model: an isobolographic analysis. Epilepsia. 2006;47:10-20.
35. Bourgeois BFD, Wad N. Combined administration of carbamazepine and phenobarbital: effect on anticonvulsant activity and neurotoxicity. Epilepsia. 1988;29:482-7.
36. Cuadrado A, De las Cuevas I, Valdizán EM, Armijo JA. Synergistic interaction between valproate and lamotrigine against seizures induced by 4-aminopyridine and pentylenetetrazole in mice. Eur J Pharmacol. 2002;453:43-52.
37. Cuadrado A, Bravo J, Armijo JA. Synergistic interaction between felbamate and lamotrigine against seizures induced by 4-aminopyridine and pentylenetetrazole in mice. Eur J Pharmacol. 2003;465:43-52.
38. Cuadrado A, Amat G, Armijo JA. Is the interaction between felbamate and valproate against seizures induced by 4-aminopyridine and pentylenetetrazole in mice beneficial? Pharmacol Res. 2003;48:183-92.
39. Cuadrado A, Armijo JA. Beneficial interaction between vigabatrin and valproate against seizures induced by pentylenetetrazole in mice. Pharmacol Res. 2005;51:489-96.

DISCUSIÓN

J. Sallés: ¿No os interesaría determinar las concentraciones cerebrales en una región específica?

J.A. Armijo: Lo hemos realizado en cerebro total. Aunque no es un método aceptado desde el punto de vista de los neurotransmisores, sí lo es para medir las concentraciones cerebrales de los antiepilépticos. Nos permite realizar un cribado inicial que nos da una primera orientación, pero luego es necesario realizar un análisis más específico.

F. Pérez-Vizcaíno: ¿En qué se diferencian los dos posibles métodos del análisis isobológico?

J.A. Armijo: En el primero se puede utilizar cualquier proporción de dosis de los dos fármacos; en el otro, la DE_{50} de la asociación de fármacos se tiene que establecer manteniendo la misma proporción, por ejemplo la que haya entre las DE_{50} de los dos fármacos, para toda la curva dosis-efecto.

C. Goicoechea: ¿Podríamos pensar que estas asociaciones también podrían ser beneficiosas en modelos de dolor crónico?

J.A. Armijo: No puedo asegurar que sea trasladable al dolor. Si os fijáis, ni los modelos ni las asociaciones están demasiado relacionados con el mecanismo de acción. Mi conclusión no ha sido que los antiepilépticos con múltiples mecanismos de acción puedan ser más útiles para utilizarlos en asociaciones, sino más bien los de amplio espectro antiepiléptico. Estamos entremezclando dos conceptos diferentes: la posibilidad de beneficio en función de mecanismos de acción complementarios y las asociaciones de fármacos que consiguen un beneficio mediante diferentes mecanismos.

F. Bosch: Si la única asociación beneficiosa que se repite en los diferentes modelos es la de valproato-lamotrigina, ¿a qué crees que podría deberse esta clara dependencia de los resultados en función del modelo experimental empleado?

J.A. Armijo: Está claro que los tres modelos no son perfectos para todos los antiepilépticos. De hecho, hemos visto que hay algunos fármacos que tienen un efecto parcial. Aun así, es interesante ver que los fármacos que a dosis bajas aumentan los efectos de otros fármacos como el felbamato, la lamotrigina y el valproato, frecuentemente son de amplio espectro. Incluso hemos observado asociaciones beneficiosas, como la de la vigabatrina, que aumenta el efecto del valproato, sin que ésta ejerza ningún efecto sobre el modelo del pentilentetrazol.

A. Badía: ¿A qué te refieres con dosis tóxica 50? ¿Tiene alguna relación con la interpretación que haríamos de forma similar a dosis letal 50?

J.A. Armijo: No, se refiere a la dosis neurotóxica 50 expresada por la incapacidad de los ratones de mantener el equilibrio durante un minuto en un rotarod.

A. Badía: En las curvas dosis-respuesta que nos has mostrado (Fig. 3) se observa una falta de paralelismo que quizá podría deberse a diferencias en el mecanismo de acción.

J.A. Armijo: Sí, aunque creo que tiene más relevancia desde un punto de vista clínico que desde el mecanismo de acción. A un paciente se le administra un antiepiléptico y, cuando llega a la dosis máxima, se le asocia otro a una dosis baja para que sea bien tolerado. Es decir, es preferible una interacción beneficiosa con una dosis baja del segundo fármaco, aunque a dosis altas también fuera beneficioso.

Efectos cognitivos, motivacionales y neuroquímicos de la administración repetida de MDMA ("éxtasis")

P. Robledo
Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias de la Salud y de la Vida,
Universitat Pompeu Fabra-IMIM, Barcelona.

Resumen: *El uso de MDMA en humanos puede producir déficit en el procesamiento cognitivo, perturbar las conductas motivacionales y aumentar los estados de ansiedad y la impulsividad. A diferencia de otros psicoestimulantes, como la anfetamina o la cocaína, esta sustancia es menos "reforzante" y produce un menor número de síntomas relacionados con la abstinencia. Este hecho podría deberse a que el perfil neuroquímico de la MDMA es complejo, puesto que aumenta tanto la cantidad de serotonina, noradrenalina y dopamina en la sinapsis, como la de acetilcolina e histamina. En estudios recientes en animales hemos demostrado que la administración repetida de MDMA modifica el aprendizaje de una tarea de evitación activa y disminuye su consolidación sin inducir cambios estructurales en las neuronas dopaminérgicas, lo que apunta a la existencia de alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión. Por otra parte, también se ve alterada la motivación por el consumo de comida altamente apetitiva, mientras que se retrasa la extinción de una respuesta operante en ausencia de este refuerzo. Puesto que la MDMA activa los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos en diferentes estructuras cerebrales implicadas en estos procesos, también se han evaluado los posibles cambios adaptativos en dichos sistemas asociados a la administración repetida de esta sustancia.*

Palabras clave: MDMA – Éxtasis – 5-HT – Efectos reforzantes – Aprendizaje.

Introducción

La MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina), popularmente llamada "éxtasis", es un derivado de las feniletilaminas sintetizado en 1912 por los laboratorios Merck como anoréxico. Durante los años 1970 e inicios de los 1980, se utilizó principalmente en América del Norte por una minoría de personas que buscaban sus efectos emocionales positivos y entactógenos. En la actualidad, su consumo se ha extendido considerablemente en Europa entre jóvenes adultos durante fiestas de fin de semana (*raves*). Aunque el potencial de abuso de la MDMA no está claramente demostrado en humanos, en modelos animales de dependencia se ha descrito que la administración repetida de MDMA puede desencadenar procesos adaptativos que conducen a la aparición de manifestaciones somáticas de abstinencia. Sin embargo, éstas no se acompañan de las clásicas alteraciones motivacionales que caracterizan los cuadros de abstinencia a otras drogas de abuso.[1,2] Actualmente existen datos claros en humanos y en animales de experimentación que muestran la capacidad de la

MDMA de producir efectos gratificantes,[2-7] que pueden contribuir a su consumo repetido. La administración reiterada de esta sustancia también puede desencadenar trastornos afectivos, como ansiedad y depresión, además de perturbaciones cognitivas.[8-9] Recientemente se ha propuesto que la administración crónica de MDMA, como de otras drogas de abuso, puede producir estados motivacionales disfuncionales asociados a conductas compulsivas y relacionados con cambios en la expresión de genes como el delta-FosB.[10] En este artículo se expondrán algunos estudios recientes, realizados en nuestro laboratorio, relacionados con los mecanismos neurobiológicos implicados en los efectos reforzantes, motivacionales y cognitivos de la MDMA.

Mecanismos neuroquímicos implicados en el refuerzo de la MDMA

La MDMA aumenta las concentraciones extracelulares de dopamina (DA), serotonina (5-HT) y noradrenalina (NE) simultáneamente, al inhibir su recaptación y retrasar su metabolización. También se ha propuesto la posibilidad de que la MDMA aumente la síntesis de DA en el núcleo estriado, efecto que parece estar mediado por la estimulación de los receptores serotonérgicos 5-HT_2. La activación del sistema dopaminérgico mesolímbico participa en los procesos de recompensa producidos por varias drogas de abuso. Así, se ha demostrado que tanto los opioides como los cannabinoides, la nicotina, el alcohol, los psicoestimulantes y la MDMA producen un aumento de dopamina en el núcleo *accumbens*.[11-16] Sin embargo, la MDMA es una sustancia atípica comparada con otros psicoestimulantes como la anfetamina o la cocaína, puesto que es menos "reforzante" y produce un menor número de manifestaciones somáticas y psicológicas relacionadas con la abstinencia. Estas diferencias pueden deberse a que la MDMA puede unirse con mayor afinidad al transportador de serotonina que al de dopamina,[17,18] y aumenta la cantidad de 5-HT y de NE en la sinapsis en mayor proporción que la DA.[19-21] Así, la MDMA representa un caso especial entre las drogas de abuso y una buena herramienta para estudiar la interacción de las tres monoaminas en los procesos adictivos.

La implicación de la 5-HT en las propiedades gratificantes de la MDMA también se ha demostrado recientemente en ratones. En este sentido, estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que los ratones *knockout* deficientes en el transportador de serotonina (SERT) no se autoadministran MDMA a una dosis que sería efectiva en ratones control (0,125 mg/kg por infusión), lo que revela una pérdida de las propiedades reforzantes de esta droga. Además, la MDMA no aumenta las concentraciones extracelulares de 5-HT en la corteza prefrontal de los ratones SERT, aunque sí se observa un aumento de DA en el núcleo *accumbens*.[22] Estos estudios indican que un aumento aislado de DA en el núcleo *accumbens* no es suficiente para la búsqueda y el consumo de MDMA, y que la transmisión serotonérgica en la corteza prefrontal desempeña un papel importante en las propiedades reforzantes de la MDMA. Por otra parte, dosis inefectivas de MDMA (3 mg/kg) en el paradigma de preferencia de plaza condicionada no aumentan las concentraciones extracelulares de DA en el núcleo *accumbens* de los ratones control,[23] pero sí aumentan desproporcionadamente las de 5-HT en la corteza prefrontal.[24] Esto sugiere que un incremento de 5-HT en la corteza prefrontal aislado tampoco basta para mediar el refuerzo de la MDMA. En general, estos datos apuntan a la existencia de una compleja dinámica de regulación recíproca entre la DA en el núcleo *accumbens* y la 5-HT en la corteza prefrontal, que modula los efectos reforzantes de la MDMA. Esta hipótesis se ve apoyada por varios estudios que muestran una interacción de estos dos neurotransmisores. Así, la 5-HT puede aumentar o disminuir la actividad dopaminérgica dependiendo de si los receptores serotonérgicos 5-HT_{2A} o 5-HT_{2C} son activados por ella.[25,26]

El papel de la NE en los efectos reforzantes de la MDMA ha sido poco estudiado. Sin embargo, datos neuroquímicos indican que la MDMA es mucho más potente para liberar NE

que ninguna de las otras monoaminas,[21] y su implicación en algunos de los efectos de la MDMA ha sido demostrada en el ratón. Así, un antagonista noradrenérgico alfa-1, la prazosina, atenúa la hipertermia, la actividad locomotora y la letalidad asociada a la administración de dosis elevadas de MDMA en el ratón.[27] Además, utilizando el paradigma de preferencia de plaza condicionada, se ha demostrado que este neurotransmisor desempeña un papel importante en las propiedades reforzantes de los psicoestimulantes tales como la anfetamina y la cocaína,[28] y también de la morfina.[29] Más recientemente se ha puesto de manifiesto un desacoplamiento entre los sistemas noradrenérgico y serotonérgico en la corteza prefrontal de ratones tratados repetidamente con anfetamina, y se cree que éste podría ser un mecanismo subyacente de la sensibilización conductual inducida por dicha sustancia.[30] Serán necesarios más estudios para valorar si esta desregulación también se produce con la administración repetida de MDMA y en qué medida contribuye al establecimiento de estados adictivos.

Efectos de la MDMA sobre las conductas reforzadas por incentivos naturales

La administración repetida de drogas de abuso produce alteraciones en la transcripción de genes que llevan a neuroadaptaciones duraderas en estructuras cerebrales[31] implicadas en procesos de refuerzo a las drogas y a incentivos naturales, tales como el núcleo *accumbens.*[32] Estos cambios neuroquímicos persistentes podrían alterar los sistemas de recompensa endógenos al modificar las propiedades incentivas de los refuerzos naturales y las propiedades reforzantes de otras drogas de abuso, contribuyendo así a su uso compulsivo. Estudios conductuales en ratas demuestran que la administración repetida de MDMA aumenta los efectos gratificantes inducidos por la cocaína[33] y facilita la adquisición de la conducta de autoadministración intravenosa de cocaína.[34] Además, estudios en ratones revelan que el tratamiento repetido con MDMA durante la adolescencia puede modificar las propiedades recompensantes de la cocaína en la edad adulta.[35] Estos datos señalan que la MDMA es capaz de sensibilizar el sistema de recompensa inducido por otras drogas psicoestimulantes como la cocaína, y por lo tanto es posible que influya en los procesos de recaída en animales abstinentes.

En cuanto a la conducta de búsqueda y consumo de refuerzos naturales, utilizando la técnica de condicionamiento operante se ha demostrado que la administración crónica de cocaína aumenta las respuestas instrumentales de las ratas para obtener una solución azucarada.[36] Cambios en la vía de la proteína cinasa A en el núcleo *accumbens* se han relacionado con dichos procesos motivacionales, puesto que su inhibición interfiere con esta conducta reforzada por la comida.[37] Por otra parte, la administración repetida de MDMA (2,5 mg/kg dos veces al día durante 15 días) incrementa la respuesta operante para obtener comida en ratas tratadas cinco días antes, y también aumenta la motivación de los animales por la comida en un paradigma de razón progresiva.[10] En experimentos recientes, realizados en nuestro laboratorio, hemos utilizado la técnica de autoadministración operante de comida para evaluar los efectos de la MDMA sobre los procesos de recompensa a refuerzos naturales en ratones. Con el fin de evaluar la motivación del animal para obtener una comida altamente apetecible (*pellets* de chocolate) tras la administración repetida de MDMA hemos utilizado el paradigma de razón progresiva, en el cual los requisitos operantes de respuesta aumentan progresivamente de acuerdo al orden 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-100. Así, el animal responde cada vez más para obtener el chocolate, hasta un punto en que cesa de trabajar. El último número de respuestas que el animal emite se denomina "*breaking point*" y es una medida directa de la motivación del animal. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento repetido con dosis altas de MDMA (30 mg/kg dos veces al día durante cuatro días) disminuye la motivación por la búsqueda de comida en este paradigma. Un

día después del test de motivación, los ratones se colocan de nuevo en las cajas operantes sin que las respuestas conduzcan a la presentación de comida. Así, el animal aprende que no habrá recompensa y cesa de responder. Esta conducta se denomina "extinción" y es una medida de aprendizaje inhibitorio. En esta prueba se evalúa la posibilidad de que el pretratamiento con MDMA aumente las conductas automáticas orientadas a la ejecución de la respuesta previamente aprendida y no a la recompensa por sí misma. En estas condiciones, se ha visto que el pretratamiento con una dosis alta de MDMA (30 mg/kg dos veces al día durante cuatro días) retrasa el proceso de extinción de la conducta de búsqueda de chocolate en ausencia del refuerzo (manuscrito en preparación). Estos resultados sugieren que la administración repetida de MDMA puede alterar el valor motivacional de los incentivos naturales apetitivos y modificar los procesos de aprendizaje relacionados con la inhibición de una respuesta inadecuada, aumentando la perseveración.

Efectos de la MDMA sobre el aprendizaje y la memoria

Numerosos estudios en humanos han asociado el uso crónico de éxtasis con alteraciones cognitivas persistentes.[38-43] El uso recreacional de MDMA también puede producir un déficit en el procesamiento emocional y aumentar los estados de ansiedad y la impulsividad. En los humanos, estos efectos se han relacionado principalmente con una disminución en los transportadores de 5-HT.[44] Sin embargo, esta disminución parece ser reversible, mientras que las alteraciones conductuales relacionadas con el uso de MDMA pueden persistir durante largo tiempo.

Experimentos en animales utilizando una variedad de paradigmas conductuales han mostrado modificaciones en los procesos de aprendizaje y memoria en ratas,[45,46] monos[47,48] y ratones[49] tratados repetidamente con MDMA. Sin embargo, el mecanismo fundamental relacionado con estas alteraciones no está dilucidado, principalmente debido a que los efectos neuroquímicos producidos por la administración crónica de MDMA varían entre especies.[9] Actualmente existen datos que demuestran que dosis altas de MDMA producen cambios en el sistema 5-HT en las ratas y los monos sin afectar el sistema de la DA,[19, 50-53] mientras que en los ratones la MDMA produce predominantemente cambios en el sistema de la DA, incluyendo una reducción de los transportadores de dopamina (DAT)[52,54] o la disminución de DA y sus metabolitos[52,53] en el estriado.

En ratas se ha demostrado que la MDMA, administrada de manera aguda, puede producir perturbaciones en la memoria de trabajo a dosis que no producen neurotoxicidad serotonérgica.[55-57] Puesto que la MDMA también aumenta las concentraciones de NE y DA en diferentes estructuras cerebrales implicadas en los procesos cognitivos, es posible que se produzcan cambios no neurotóxicos en estos sistemas de neurotransmisión que contribuyan a la persistencia de las alteraciones conductuales observadas. En estudios recientes hemos evaluado el efecto de la administración repetida de MDMA antes y después de un aprendizaje de evitación activa en ratones. Este paradigma consiste en dos compartimentos separados por una puerta, donde los animales aprenden a evitar una descarga eléctrica cambiando de compartimento tras la presentación de una luz blanca. Así, hemos estudiado el efecto de la MDMA sobre este aprendizaje cuando se administra antes o después del entrenamiento, y también sobre la memoria de la tarea aprendida. Los resultados muestran que el pretratamiento con altas dosis de MDMA (30 mg/kg dos veces al día durante cuatro días) perturba el aprendizaje de esta tarea desde el sexto día de entrenamiento, mientras que las dosis moderadas sólo producen alteraciones en el último día de entrenamiento (día 10). La dosis baja (1 mg/kg), por el contrario, no produjo ninguna perturbación significativa en ninguno de los días de entrenamiento con respecto a los controles. Sin embargo, tras cinco días de reposo, la memoria de la tarea se vio afectada significativamente con todas las dosis estudiadas. En contraste, la administración de

MDMA después del entrenamiento de evitación activa no originó ninguna pérdida de memoria de la tarea aprendida. La cantidad de transportadores de DA en el estriado, evaluada 27 días después de la última inyección de MDMA, no se vio afectada con respecto a la administración de solución salina.[58] Este dato indica que la MDMA puede perturbar el aprendizaje y la memoria de nuevas tareas sin inducir cambios estructurales en las neuronas dopaminérgicas, y apuntan a la existencia de alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión implicados en estos procesos. Los resultados sugieren que los efectos adversos de la MDMA sobre la consolidación de nueva información podrían constituir un problema mayor en el caso de consumidores adolescentes en edad escolar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Robledo P. Aspectos neurobiológicos de la adicción al MDMA. En: De Felipe C, coord. Aspectos básicos y clínicos sobre la neurobiología de la adicción. Monografías Dr. Antonio Esteve, nº 31. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 2003. p. 75-81.
2. Robledo P, Balerio G, Berrendero F, Maldonado R. Study of the behavioral responses related to the potential addictive properties of MDMA in mice. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004;369:338-49.
3. Bilsky EJ, Hubbell CL, Delconte JD, Reid LD. MDMA produces a conditioned place preference and elicits ejaculation in male rats: a modulatory role for the endogenous opioids. Pharmacol Biochem Behav. 1991;40:443-7.
4. Camí J, Farré M, Mas M, Roset PN, Poudevida S, Mas A, et al. Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"): psychomotor performance and subjective effects. J Clin Psychopharmacol. 2000;20:455-66.
5. Fantegrossi WE, Ullrich T, Rice KC, Woods JH, Winger G. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, «ecstasy») and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. Psychopharmacology (Berl). 2002;16:356-64.
6. Salzmann J, Marie-Claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F. Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. Br J Pharmacol. 2003;140:831-8.
7. Trigo JM, Panayi F, Soria G, Maldonado R, Robledo P. A reliable model of intravenous MDMA self-administration in naive mice. Psychopharmacology (Berl). 2006;184:212-20.
8. Morgan MJ, McFie L, Fleetwood H, Robinson JA. Ecstasy (MDMA): are the psychological problems associated with its use reversed by prolonged abstinence? Psychopharmacology (Berl). 2002;159:294-303.
9. Easton N, Marsden CA. Ecstasy: are animal data consistent between species and can they translate to humans? J Psychopharmacol. 2006;20:194-210.
10. Olausson P, Jentsch JD, Tronson N, Neve RL, Nestler EJ, Taylor JR. DeltaFosB in the nucleus accumbens regulates food-reinforced instrumental behavior and motivation. J Neurosci. 2006;26:9196-204.
11. Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. Science. 1997;276:2048-50.
12. Yamamoto BK, Spanos LJ. The acute effects of methylenedioxymethamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. Eur J Pharmacol. 1988;148:195-203.
13. Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. Nature. 1996;18:255-7.
14. Yoshimoto K, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. Alcohol. 1992;9:17-22.
15. Camarero J, Sánchez V, O'Shea E, Green AR, Colado MI. Studies, using in vivo microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR12909 on 3,4 methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy')-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. J Neurochem. 2002;81:961-72.
16. Robledo P, Mendizábal V, Ortuno J, De la Torre R, Kieffer BL, Maldonado R. The rewarding properties of MDMA are preserved in mice lacking mu-opioid receptors. Eur J Neurosci. 2004;20:853-8.
17. Rothman RB, Baumann MH. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. Eur J Pharmacol. 2003;479:23-40.
18. Han DD, Gu HH. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse

in their sensitivities to psychostimulant drugs. BMC Pharmacol. 2006;6:6.
19. Schmidt CJ, Levin JA, Lovenberg W. In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. Biochem Pharmacol. 1987;36:747-55.
20. Koch S, Galloway MP. MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. J Neural Transm. 1997;104:135-46.
21. Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. Synapse. 2001;39:32-41.
22. Trigo JM, Renoir T, Lanfumey L, Hamon M, Lesch KP, Robledo P, et al. 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration is abolished in serotonin transporter knockout mice. Biol Psychiatry. 2007;62:669-79.
23. Robledo P, Trigo JM, Panayi F, De la Torre R, Maldonado R. Behavioural and neurochemical effects of combined MDMA and THC administration in mice. Psychopharmacology (Berl). 2007;195:255-64.
24. Orejarena MJ, Trigo JM, Maldonado R, Robledo P. Behavioural and neurochemical effects of combined MDMA and THC administration: dopamine and serotonin transmission in mice. 8ª Reunión Anual de la SEIC, Bilbao, noviembre 2007.
25. Navailles S, Moison D, Cunningham KA, Spampinato U. Differential regulation of the mesoaccumbens dopamine circuit by serotonin 2C receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study with cocaine. Neuropsychopharmacology. 2008;33:237-46.
26. Alex KD, Pehek EA. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. Pharmacol Ther. 2007;113: 296-320.
27. Fantegrossi WE, Godlewski T, Karabenick RL, Stephens JM, Ullrich T, Rice KC, et al. Pharmacological characterization of the effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") and its enantiomers on lethality, core temperature, and locomotor activity in singly housed and crowded mice. Psychopharmacology (Berl). 2003;166:202-11.
28. Ventura R, Cabib S, Alcaro A, Orsini C, Puglisi-Allegra S. Norepinephrine in the prefrontal cortex is critical for amphetamine-induced reward and mesoaccumbens dopamine release. J Neurosci. 2003;23:1879-85.
29. Ventura R, Alcaro A, Puglisi-Allegra S. Prefrontal cortical norepinephrine release is critical for morphine-induced reward, reinstatement and dopamine release in the nucleus accumbens. Cereb Cortex. 2005;15:1877-86.
30. Lanteri C, Salomon L, Torrens Y, Glowinski J, Tassin JP. Drugs of abuse specifically sensitize noradrenergic and serotonergic neurons via a non-dopaminergic mechanism. Neuropsychopharmacology. 2007; PMID: 17805311.
31. Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. Neuropharmacology. 2004;47:24-32.
32. Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. J Neurosci. 2002;22:3306-11.
33. Horan B, Gardner EL, Ashby CR, Jr. Enhancement of conditioned place preference response to cocaine in rats following subchronic administration of 3,4, methylenedioxymethamphetamine (MDMA). Synapse. 2000;35:160-2.
34. Fletcher PJ, Robinson SR, Slippoy DL. Pre-exposure to (+/-)3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) facilitates acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. Neuropsychopharmacology. 2001;25:195-203.
35. Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y. Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. Neuropharmacology. 2003;45:106-15.
36. Miles FJ, Everitt BJ, Dalley JW, Dickinson A. Conditioned activity and instrumental reinforcement following long-term oral consumption of cocaine by rats. Behav Neurosci. 2004;118:1331-9.
37. Hernández PJ, Sadeghian K, Kelley AE. Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. Nat Neurosci. 2002;5:1327-31.
38. Morgan MJ, McFie L, Fleetwood H, Robinson JA. Ecstasy (MDMA): are the psychological problems associated with its use reversed by prolonged abstinence? Psychopharmacology (Berl). 2002;159:294-303.
39. Bhattachary S, Powell JH. Recreational use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) or 'ecstasy': evidence for cognitive impairment. Psychol Med. 2001;31:647-58.
40. Dafters RI. Chronic ecstasy (MDMA) use is associated with deficits in task-switching but not inhibition or memory updating executive functions. Drug Alcohol Depend. 2006;83:181-4.

41. Quednow BB, Jessen F, Kuhn KU, Maier W, Daum I, Wagner M. Memory deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal dysfunction. J Psychopharmacol. 2006;20:373-84.
42. Zakzanis KK, Campbell Z. Memory impairment in now abstinent MDMA users and continued users: a longitudinal follow-up. Neurology. 2006;66:740-1.
43. Kalechstein AD, De la Garza R, Mahoney JJ, Fantegrossi WE, Newton TF. MDMA use and neurocognition: a meta-analytic review. Psychopharmacology (Berl). 2007;189:531-7.
44. Parrott AC. MDMA in humans: factors which affect the neuropsychobiological profiles of recreational ecstasy users, the integrative role of bioenergetic stress. J Psychopharmacol. 2006;20:147-63.
45. Sprague JE, Preston AS, Leifheit M, Woodside B. Hippocampal serotonergic damage induced by MDMA (ecstasy): effects on spatial learning. Physiol Behav. 2003;79:281-7.
46. Skelton MR, Williams MT, Vorhees CV. Treatment with MDMA from P11-20 disrupts spatial learning and path integration learning in adolescent rats but only spatial learning in older rats. Psychopharmacology (Berl). 2006;189:307-18.
47. Taffe MA, Weed MR, Davis S, Huitron-Resendiz S, Schroeder R, Parsons LH, et al. Functional consequences of repeated (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treatment in rhesus monkeys. Neuropsychopharmacology. 2001;24:230-9.
48. Frederick DL, Paule MG. Effects of MDMA on complex brain function in laboratory animals. Neurosci Biobehav Rev. 1997;21:67-78.
49. Glennon RA, Little PJ, Rosecrans JA, Yousif M. The effect of MDMA ("ecstasy") and its optical isomers on schedule-controlled responding in mice. Pharmacol Biochem Behav. 1987;26:425-6.
50. Ricaurte G, Bryan G, Strauss L, Seiden L, Schuster C. Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. Science. 1985;229: 986-8.
51. Mayerhofer A, Kovar KA, Schmidt WJ. Changes in serotonin dopamine and noradrenaline levels in striatum and nucleus accumbens after repeated administration of the abused drug MDMA in rats. Neurosci Lett. 2001;308:99-102.
52. Green AR, Mechan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). Pharmacol Rev. 2003;55:463-508.
53. Colado MI, O'Shea E, Green AR. Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function. Psychopharmacology. 2004;173:249-63.
54. Kindlundh-Högberg AM, Schiöth HB, Svenningsson P. Repeated intermittent MDMA binges reduce DAT density in mice and SERT density in rats in reward regions of the adolescent brain. Neurotoxicology. 2007;28:1158-69. Epub 2007 Jul 10.
55. Barrionuevo M, Aguirre N, Del Río JD, Lasheras B. Serotonergic deficits and impaired passive-avoidance learning in rats by MDEA: a comparison with MDMA. Pharmacol Biochem Behav. 2000;65:233-40.
56. Braida D, Pozzi M, Cavallini R, Sala M. 3,4 methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) impairs eight-arm radial maze performance and arm entry pattern in rats. Behav Neurosci. 2002;116:298-304.
57. Young JM, McGregor IS, Mallet PE. Co-administration of THC and MDMA ('ecstasy') synergistically disrupts memory in rats. Neuropsychopharmacology. 2005;30:1475-82.
58. Trigo JM, Cabrero-Castel A, Berrendero F, Maldonado R, Robledo P. MDMA modifies active avoidance learning and recall in mice. Psychopharmacology. 2008;197:391-400. Epub 2008 Jan 10.

DISCUSIÓN

M.J. Sanz: ¿Como extrapolamos estos resultados obtenidos en ratones a los jóvenes que toman éxtasis los fines de semana?

P. Robledo: Los humanos toman 70 a 100 mg/pastilla, es decir, 1-3 mg/kg. Por eso, en el último estudio que os he mostrado, tratamos de administrar dosis bajas al animal de experimentación porque queremos modelizar lo que está sucediendo en el humano.

F. Bosch: Creo que no has comentado nada sobre el sistema cannabinoide. Si no estoy equivocado, vuestro grupo ha publicado re-

cientemente un trabajo en el cual se evidencia la participación del sistema cannabinoide sobre la acción de la MDMA.

P. Robledo: Sí, el sistema cannabinoide endógeno está implicado en los mecanismos de recompensa de otras drogas de abuso, como la cocaína y el alcohol, y es cierto que también existen interacciones con la MDMA.

E. Vila: Nos has mostrado un experimento en el cual los ratones que se autoadministraban MDMA no presentaban un aumento de las concentraciones basales de dopamina, y en cambio sí aumentaban en los ratones sin MDMA. ¿Cuál es la fisiopatología de este cambio adaptativo?

P. Robledo: La MDMA bloquea los transportadores de las tres monoaminas, lo que induce una liberación masiva. Creemos que tras 10 días de autoadministración repetida se produce una regulación de las neuronas dopaminérgicas en el núcleo *accumbens* por algún tipo de mecanismo que aún desconocemos.

M.J. Ramírez: ¿Habéis intentado revertir el déficit cognitivo con algún fármaco?

P. Robledo: No, todavía no hemos llegado a ello, pero sería interesante probar a revertirlo.

J.M. Baeyens: ¿Se han descrito interacciones con antidepresivos en animales? ¿Se ha observado algún patrón de asociación de antidepresivos con MDMA en humanos?

P. Robledo: Es un tema complicado. Los consumidores de MDMA toman fluoxetina para evitar los efectos periféricos de la MDMA, pero desconozco si hay algún caso de consumo concomitante de antidepresivos. Además, los experimentos con ratones deficientes en el transportador de serotonina, que puede considerarse un modelo de animal tratado crónicamente con antidepresivos, muestran que la MDMA pierde su efecto reforzante. Sí es cierto que los consumidores de éxtasis normalmente compensan la anedonia y la depresión que sienten después de tomar MDMA con cualquier otra droga, como benzodiacepinas o cannabis.

J. Burgueño: Me ha llamado la atención los protocolos tan largos que utilizáis y me gustaría saber si con otras drogas también son así.

P. Robledo: Sí, llevar un animal de un FR1 a un FR5 requiere 15 días para que se estabilice la respuesta. En los protocolos de autoadministración depende de la capacidad reforzante de la droga. Con la MDMA, al ser poco reforzante, los animales tardan más en aprender a autoadministrarse; sin embargo, con la cocaína adquieren la conducta mucho más rápido.

J. Burgueño: La MDMA induce un aumento de serotonina en la corteza prefrontal, pero en ratones *knockout* deficientes en el transportador de serotonina esta liberación no sucede. ¿Por qué?

P. Robledo: Al no tener el transportador, la MDMA no puede liberar serotonina. Lo interesante de estos resultados es que la MDMA aumenta la dopamina en animales que no se autoadministran esta droga. Esto apunta a una disociación entre los efectos reforzantes de la MDMA y un aumento aislado de dopamina en el núcleo *accumbens*.

J. Sallés: Nos has presentado datos sobre la extinción de la conducta y quisiera relacionarlo con el sistema endocannabinoide, antes mencionado, ya que está claramente implicado en la extinción de memorias aversivas. ¿Qué datos tenéis sobre este sistema en el tratamiento con MDMA?

P. Robledo: Ninguno. En realidad, en los estudios con comida no investigamos la extinción de memorias aversivas, sino más bien lo contrario. De todos modos, sería interesante estudiar el papel del sistema endocannabinoide en nuestro modelo.

Consecuencias funcionales inmediatas y a largo plazo de la administración de MDMA en roedores

M.I. Colado
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Resumen: *El efecto adverso predominante que se observa inmediatamente después de la ingestión de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, "éxtasis") por los consumidores habituales de esta droga es la hipertermia, la cual, a su vez, puede desencadenar otros problemas clínicos asociados y ocasionalmente la muerte. No existe un tratamiento farmacológico específico. La MDMA también induce un incremento, dependiente de la dosis, de la temperatura corporal en los animales de experimentación. En la rata, la hipertermia resulta principalmente de la liberación de dopamina y está influenciada por la dosis, la temperatura ambiente y las condiciones de almacenamiento. La respuesta aumenta en las ratas con una lesión de los terminales nerviosos serotoninérgicos inducida por la administración previa de una dosis neurotóxica de MDMA. La hiperactividad locomotora que induce la MDMA no parece desempeñar un papel importante en la respuesta hipertérmica. Sin embargo, el tamaño de la respuesta hipertérmica inmediata es determinante para la gravedad de la neurotoxicidad subsiguiente. Se podría concluir que cualquier respuesta hipertérmica inducida por MDMA será potenciada en ambientes calurosos y masificados, y que la ingestión de la droga en tales condiciones incrementa la posibilidad de aparición de un efecto neurotóxico cerebral. A pesar de la estrecha relación entre la respuesta hipertérmica y la neurotoxicidad, es posible observar neurotoxicidad en ausencia de hipertermia, con lo que la hipertermia ejercería un importante papel modulador, aunque no un factor esencial, en la neurotoxicidad ocasionada por MDMA.*

Palabras clave: MDMA – Éxtasis – Hipertermia – Neurotoxicidad serotoninérgica – Neurotoxicidad dopaminérgica.

Introducción

La administración de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, "éxtasis") produce en los animales de experimentación un efecto neuroquímico característico en el cual se diferencian efectos agudos, que son reversibles, y efectos a largo plazo, que son persistentes y se consideran neurotóxicos.[1]

Los efectos agudos consisten en una rápida hipertermia, que puede durar varias horas, asociada con la liberación de monoaminas. Tras la administración de MDMA se observa un incremento, dependiente de la dosis, de la temperatura rectal de los animales, que oscila entre 1,5 y 2 ºC y alcanza un pico aproximadamente una hora después de la inyección. Esta respuesta hipertérmica se mantiene por lo menos doce horas.[2-4] El efecto que produce la MDMA sobre la temperatura corporal está estrechamente unido a la temperatura ambiente a la que se administra la droga. A una

temperatura de 20-22 °C, la administración de MDMA generalmente produce una marcada respuesta hipertérmica; por el contrario, a 10-11 ºC se observa hipotermia.[5]

La hipertermia desempeña un papel determinante en la expresión de la neurotoxicidad inducida por MDMA, de modo que las respuestas térmicas son predictivas, en parte, de la gravedad de las reducciones en los marcadores bioquímicos producidas por MDMA. Estudios en diferentes condiciones ambientales han demostrado que el mantenimiento de los animales a 10 ºC antes o después del tratamiento con MDMA previene la respuesta hipertérmica, y atenúa, e incluso elimina, la neurotoxicidad de la droga. Por el contrario, en ambientes calurosos (26-33 ºC), tanto la respuesta hipertérmica como la neurotoxicidad están potenciadas.[5,6] A pesar de esta estrecha relación entre la hipertermia aguda y la neurotoxicidad a largo plazo, el papel exacto que desempeña la hipertermia en la respuesta neurotóxica es difícil de definir, pues es posible observar neurotoxicidad en ausencia de hipertermia. Así, la administración de dosis bajas y repetidas de MDMA produce una marcada disminución de terminales serotoninérgicos, pero no aumenta la temperatura corporal.[7] Por tanto, la ausencia de una respuesta hipertérmica no parece ofrecer garantía de que se evite el daño cerebral a largo plazo. Existen otros factores, como dosis elevadas o un incremento en la frecuencia de administración, que pueden superar la carencia de una respuesta hipertérmica para producir neurotoxicidad.[6] En conjunto, estos datos indican que la hipertermia ejerce un importante papel modulador, pero no es un factor esencial en la neurotoxicidad ocasionada por MDMA.

Se sabe que la MDMA aumenta la liberación de dopamina y serotonina en diversas estructuras cerebrales, alguna de ellas (núcleo *accumbens*) encargada de las propiedades incentivo-motivacionales de la mayoría de las drogas de abuso. Recientemente se ha demostrado que una temperatura ambiente elevada donde se administra la droga potencia la liberación de dopamina y serotonina que induce la MDMA en el núcleo *accumbens*. Sin embargo, este efecto no se observa en el estriado. La hiperactividad locomotora que produce la MDMA también es más pronunciada cuando los animales se mantienen a una temperatura ambiente elevada.[8] Otros laboratorios han demostrado que ambientes calurosos potencian el efecto prosocial de la MDMA y aumentan el número de infusiones de MDMA que se autoadministran los animales.[9] Estos datos sugieren que las propiedades de refuerzo de la MDMA son más pronunciadas a temperatura ambiente elevada, y sugieren que el entusiasmo de los consumidores recreativos por tomar la droga en ambientes calurosos puede no ser una coincidencia.

Neurotoxicidad serotoninérgica producida por MDMA y sus consecuencias funcionales

El efecto neurotóxico de la MDMA en los roedores es específico de la especie, en el sentido de que existen marcadas diferencias entre el daño neuronal que produce en la rata y el que se observa en el ratón. En la rata aparece una degeneración selectiva de los terminales nerviosos serotoninérgicos en diversas regiones cerebrales. Por el contrario, en el ratón se manifiesta una disminución en la densidad de los terminales dopaminérgicos, dejando intactas las neuronas que contienen serotonina. Es interesante señalar que la neurotoxicidad en la rata ya se manifiesta tras la administración de una única dosis de MDMA, mientras que en el ratón requiere la administración repetida de la droga y dosis más altas que las utilizadas en la rata. En el cobayo y los primates no humanos, el efecto neurotóxico es cualitativamente similar al que se observa en la rata.[1]

La neurotoxicidad serotoninérgica se manifiesta por una disminución de la concentración de serotonina y su metabolito, del número de transportadores de serotonina y de la densidad de terminales y axones serotoninérgicos.[7,10]

Estudios realizados en ratas han demostrado que una de las consecuencias a largo plazo de la neurotoxicidad que produce la MDMA es una alteración en la termorregulación, que se manifiesta porque los animales son menos ca-

paces de perder calor cuando se exponen a una temperatura ambiente elevada.[11] Este defecto en la termorregulación también se observa en las ratas que presentan una lesión serotoninérgica y que son expuestas de nuevo a la droga en ambientes calurosos.[12] Puesto que los consumidores generalmente ingieren MDMA en ambientes masificados y a elevada temperatura, estos datos sugieren que en estos individuos (si presentan una lesión serotoninérgica) puede aparecer una respuesta hipertérmica más pronunciada, y que el consumo de la droga en tales condiciones aumenta la posibilidad de un efecto neurotóxico cerebral.

Un estudio demostró que la temperatura de la cola de la rata no se modifica tras la administración de una dosis de MDMA que produce un aumento significativo de la temperatura rectal.[13] Incluso la temperatura de la cola disminuye cuando la MDMA se administra a ratas mantenidas a elevada temperatura ambiente, exactamente lo contrario de lo que cabría esperar si el animal fuera capaz de termorregularse y perder calor.[14] Puesto que la dilatación de los vasos de la cola es el principal mecanismo por el cual las ratas pierden calor,[15] estos resultados sugieren que la MDMA interfiere con los mecanismos de pérdida de calor y, consecuentemente, cuanto más elevada sea la temperatura ambiente más dificultad habrá para perder calor al medio.

La disminución en la función serotoninérgica que induce la MDMA a largo plazo está implicada en la deficitaria respuesta termorreguladora que muestran los animales lesionados con MDMA. Así, se ha observado que la hipertermia inducida por MDMA a una temperatura ambiente elevada también es más pronunciada y sostenida en los animales pretratados con p-clorofenilalanina (inhibidor de la síntesis de serotonina).[16] Por tanto, parece razonable afirmar que, para facilitar la pérdida de temperatura corporal en condiciones ambientales de temperatura elevada, es necesaria la existencia de mecanismos serotoninérgicos funcionalmente intactos.

Se ha estudiado el efecto de la lesión neurotóxica producida por MDMA sobre la respuesta ansiolítica o ansiogénica de los animales a largo plazo. Los resultados en el test del laberinto elevado en cruz son contradictorios: las ratas Wistar pretratadas con MDMA manifiestan una respuesta ansiogénica, mientras que las ratas Dark Agouti muestran una respuesta ansiolítica. Es interesante señalar que el grado de ansiedad basal de ambos tipos de ratas es diferente, mucho más pronunciado en las Dark Agouti. No obstante, en las ratas expuestas a MDMA también se ha observado un efecto ansiogénico a largo plazo sin toxicidad serotoninérgica. Por tanto, parece razonable proponer que una respuesta emocional alterada no necesariamente se debe a un déficit serotoninérgico sino a respuestas adaptativas que ocurren en el cerebro tras la administración de la droga.[17] Otras alteraciones funcionales observadas a largo plazo tras la administración de MDMA consisten en alteraciones del ritmo circadiano, de la actividad motora y de la generación del sueño.[18]

La existencia de daño neurotóxico en el cerebro de los consumidores habituales de MDMA continúa siendo materia de controversia; no obstante, en estos individuos se han detectado cambios neuroquímicos, fisiológicos y psicológicos compatibles con una disminución de la función serotoninérgica.[19-21]

Neurotoxicidad dopaminérgica de la MDMA en el ratón y consecuencias funcionales

En el ratón, la MDMA produce un daño relativamente selectivo sobre las vías dopaminérgicas, dejando intactas las neuronas que contienen serotonina.[22,23] Esta neurotoxicidad se refleja por una disminución en la concentración de dopamina y sus metabolitos, y en la densidad del transportador de dopamina en el estriado y el núcleo *accumbens*.[24,25] Mediante inmunohistoquímica también se ha demostrado que la MDMA disminuye la inmunorreactividad del transportador de dopamina, y utilizando MOR-1, un marcador de estriosomas, se ha observado que esta disminución es significativamente más pronunciada en los estriosomas que en la matriz estriatal, lo cual indica que la neurotoxicidad inducida por MDMA en el ratón

se asocia fundamentalmente con una pérdida de fibras dopaminérgicas estriosomales. Los estriosomas están estrechamente unidos a regiones límbicas y funcionalmente se asocian con comportamientos de refuerzo y acontecimientos neuronales inducidos por psicoestimulantes y antipsicóticos.[26]

En línea con estos resultados, se ha demostrado que la exposición a una dosis neurotóxica de MDMA puede influir de manera importante en la regulación de la ingesta de alcohol. Utilizando un test de libre elección de dos pipetas, los ratones con un déficit en la función dopaminérgica por la exposición previa a dosis neurotóxicas de MDMA muestran un aumento en el consumo y la preferencia por etanol en comparación con los ratones inyectados con solución salina.[27] Estas diferencias entre los animales lesionados con MDMA y los controles no son secundarias a cambios en el metabolismo del etanol ni a cambios en las preferencias de sabor o las necesidades calóricas. El agonista de los receptores D1 SKF81297 disminuyó el consumo de etanol en los animales lesionados con MDMA, un efecto que fue revertido por la administración del antagonista D1 SCH23390. Los ratones expuestos a MDMA también mostraron una menor liberación basal de dopamina en el núcleo *accumbens* y un modesto incremento en la densidad de los receptores D1 en el caudado-putamen y en el núcleo *accumbens*. La administración intraperitoneal de etanol aumenta la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens* de los ratones control, pero este efecto estaba prácticamente abolido en los animales expuestos a MDMA. En conjunto, estos resultados sugieren que los animales lesionados con MDMA necesitan consumir más alcohol para alcanzar el umbral de los efectos reforzantes que produce el etanol.

BIBLIOGRAFÍA

1. Green AR, Mechan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). Pharmacol Rev. 2003;55:463-508.
2. Colado MI, Williams JL, Green AR. The hyperthermic and neurotoxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and 3,4 methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. Br J Pharmacol. 1995;115:1281-9.
3. Colado MI, O'Shea E, Granados R, Murray TK, Green AR. In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. Br J Pharmacol. 1997;121:889-900.
4. Orio L, O'Shea E, Sánchez V, Pradillo JM, Escobedo I, Camarero J, et al. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) increases IL-1β levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. J Neurochem. 2004;89:1445-53.
5. Broening HW, Bowyer JF, Slikker Jr. W. Age-dependent sensitivity of rats to the long-term effects of the serotonergic neurotoxicant (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response. J Pharmacol Exp Ther. 1995;275:325-33.
6. Sánchez V, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI, Green AR. Effect of repeated ('binge') dosing of MDMA to rats housed at normal and high temperature on neurotoxic damage to cerebral 5-HT and dopamine neurones. J Psychopharmacol. 2004;18:412-6.
7. O'Shea E, Granados R, Esteban B, Colado MI, Green AR. The relationship between the degree of neurodegeneration of rat brain 5-HT nerve terminals and the dose and frequency of administration of MDMA ('ecstasy'). Neuropharmacology. 1998;37:919-26.
8. O'Shea E, Escobedo I, Orio L, Sánchez V, Navarro M, Green AR, et al. Elevation of ambient room temperature has differential effects on MDMA-induced 5-HT and dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rats. Neuropsychopharmacology. 2005;30:1312-23.
9. Cornish JL, Shahnawaz Z, Thompson MR, Wong S, Morley KC, Hunt GE, et al. Heat increases 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration and social effects in rats. Eur J Pharmacol. 2003;15:482: 339-41.
10. O'Hearn E, Battaglia G, De Souza EB, Kuhar MJ, Molliver ME. Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotoner-

gic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. J Neurosci. 1988;8:2788-803.
11. Mechan AO, O'Shea E, Elliott JM, Colado MI, Green AR. A neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy) to rats results in a long term defect in thermoregulation. Psychopharmacology. 2001;155:413-8.
12. Green AR, Sánchez V, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI. Effect of ambient temperature and a prior neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on the hyperthermic response of rats to a single or repeated ('binge' ingestion) low dose of MDMA. Psychopharmacology. 2004;173:264-9.
13. Mechan AO, Esteban B, O'Shea E, Elliott JM, Colado MI, Green AR. The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats. Br J Pharmacol. 2002;135:170-80.
14. Green AR, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI. Studies on the effect of MDMA ('ecstasy') on the body temperature of rats housed at different ambient room temperatures. Br J Pharmacol. 2005;146:306-12.
15. Grant RT. Vasodilatation and body warming in the rat. J Physiol. 1963;167:311-7.
16. Saadat KS, O'Shea E, Colado MI, Elliott JM, Green AR. The role of 5-HT in the impairment of thermoregulation observed in rats administered MDMA ('ecstasy') when housed at high ambient temperature. Psychopharmacology. 2005;179:884-90.
17. Green AR, McGregor IS. On the anxiogenic and anxiolytic nature of long-term cerebral 5-HT depletion following MDMA. Psychopharmacology. 2002;162:448-50.
18. Balogh B, Molnar E, Jakus R, Quate L, Olverman HJ, Kelly PA, et al. Effects of a single dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on circadian patterns, motor activity and sleep in drug-naive rats and rats previously exposed to MDMA. Psychopharmacology. 2004;173:296-309.
19. Guillot C. Is recreational ecstasy (MDMA) use associated with higher levels of depressive symptoms? J Psychoactive Drugs. 2007;39:31-9.
20. McCann UD, Szabo Z, Seckin E, Rosenblatt P, Mathews WB, Ravert HT, et al. Quantitative PET studies of the serotonin transporter in MDMA users and controls using [11C]McN5652 and [11C]DASB. Neuropsychopharmacology. 2005;30:1741-50.
21. McCann UD, Ricaurte GA. Effects of (+/-) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on sleep and circadian rhythms. ScientificWorldJournal. 2007;7:231-8.
22. Colado MI, Camarero J, Mechan AO, Sánchez V, Esteban B, Elliot JM, et al. A study of the mechanism involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurons in mouse brain. Br J Pharmacol. 2001;134:1711-23.
23. Camarero J, Sánchez V, O'Shea E, Green AR, Colado MI. Studies, using in vivo microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 on 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy')-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. J Neurochem. 2002;81:961-72.
24. Mann H, Ladenheim B, Hirata H, Moran TH, Cadet JL. Differential toxic effects of methamphetamine (METH) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in multidrug-resistant (mdr1a) knockout mice. Brain Res. 1997;769:340-6.
25. Escobedo I, O'Shea E, Orio L, Sánchez V, Segura M, De la Torre R, et al. A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. Br J Pharmacol. 2005;144:231-41.
26. Granado N, Escobedo I, O'Shea E, Colado MI, Moratalla R. Early loss of dopaminergic terminals in striosomes after MDMA administration to mice. Synapse. 2008;62:80-4.
27. Izco M, Marchant I, Escobedo I, Peraile I, Delgado M, Higuera-Matas A, et al. Mice with decreased cerebral dopamine function following a neurotoxic dose of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine, "Ecstasy") exhibit increased ethanol consumption and preference. J Pharmacol Exp Ther. 2007;322:1003-12.

DISCUSIÓN

M.J. Ramírez: ¿Por qué existen estas diferencias en el ratón?

M.I. Colado: No lo sabemos. El ratón es extraordinariamente resistente a los efectos tóxicos

de la MDMA. Así como en la rata la toxicidad se manifiesta con una dosis única de 10 mg/kg, en el ratón se necesitan 10-30 mg/kg, tres veces consecutivas, cada tres horas.

J. Sallés: ¿El motivo de que utilicéis ratas Dark Agouti es por su metabolismo hepático a través de citocromo P450 2D6?

M.I. Colado: No del todo. Con esta cepa los resultados son muy reproducibles y además son muy sensibles a las drogas de diseño. Aparte, es cierto que las hembras son deficitarias del CYP2D6 y manifiestan una hipertermia y una mortalidad más elevadas que los machos.

J. Sallés: Por lo tanto, esto tendría que tenerse en cuenta en los individuos que son metabolizadores lentos.

M.I. Colado: Exacto. Aproximadamente el 9% de la población es deficitaria en el CYP2D6, lo que significa que metabolizan la droga de forma más lenta, las concentraciones plasmáticas son más elevadas y pueden aparecer un mayor grado de hipertermia y mortalidad tras el consumo de MDMA.

S. Erill: Las diferencias en los efectos de la MDMA en función de la temperatura me recuerdan a la dosis letal 50 de la anfetamina, que es distinta si se administra a ratas individuales o a un conjunto de ratas metidas en una jaula, y que esta diferencia desaparece al colocar un ventilador junto a la jaula.

M.I. Colado: Sí, la agregación potencia la toxicidad de la droga.

M.J. Sanz: Cuando mencionas las alteraciones cognitivas de la memoria, ¿te refieres a cuando la persona está bajo los efectos de la droga o es un efecto a largo plazo?

M.I. Colado: Son efectos a largo plazo.

M.J. Sanz: En referencia al efecto ansiogénico o ansiolítico observado dependiendo de la cepa utilizada, ¿qué ocurre en el humano y cuál sería el animal de elección? ¿La rata es un buen modelo?

M.I. Colado: En cuanto a toxicidad, la rata es un buen modelo. En el humano también hay evidencias de que el "éxtasis" produce neurotoxicidad serotonérgica, y no existen cambios en el sistema dopaminérgico. Lo que sucede es que las ratas Dark Agouti presentan un grado de ansiedad basal más elevado, y tras una lesión con MDMA se observa un efecto ansiolítico. En cambio, en otras cepas con una ansiedad basal más baja, como las Wistar, tras la lesión se observa un efecto ansiogénico.

A.M. Planas: Has hablado de pérdida de terminales serotoninérgicos. ¿También están afectados los cuerpos neuronales? ¿Genera reactividad microglial esta pérdida de terminales?

M.I. Colado: La mayor parte de los estudios coinciden en que no hay una afectación del cuerpo neuronal. Sí se ha observado un aumento de la actividad microglial, que es máxima 24 horas después de la administración de la droga. Por eso, actualmente estamos intentando usar inhibidores de la activación de la microglía como neuroprotectores.

J. Llenas: El metilfenilato es otro derivado anfetamínico que cada vez tiene más uso entre los escolares, especialmente en épocas de exámenes. Aparentemente es muy seguro, ¿pero existe algún estudio en que se haya valorado su falta de neurotoxicidad cuando se usa de forma crónica?

M.I. Colado: Creo que no hay estudios serios que hayan evaluado la neurotoxicidad del metilfenilato a largo plazo. Anteriormente se utilizaba para tratar el síndrome de hiperactividad, pero ahora se recurre a los antidepresivos para evitar una posible neurotoxicidad al ser un derivado anfetamínico.

Estudios experimentales en dolor agudo e inflamatorio: el modelo de la administración intraplantar de formalina en el ratón

C.M. Cendán
Departamento de Farmacología e Instituto de Neurociencias,
Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

Resumen: *La inyección de formalina produce una respuesta dolorosa bifásica, con una primera fase de corta duración (primeros 5 minutos) debida a la activación de los nociceptores de la pata y una segunda fase (10-50 minutos después de la inyección) debida a una respuesta inflamatoria con sensibilización de las neuronas nociceptoras de la médula espinal. Por lo tanto, es un modelo válido y sensible para el estudio de diferentes clases de analgésicos. Se evaluaron fármacos con uso clínico (morfina, diclofenaco, haloperidol y (-)sulpirida), así como compuestos experimentales. También se realizaron estudios en animales transgénicos (*knockout*, deficientes en receptores σ_1) y tratados con oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN) frente al receptor σ_1. La administración de haloperidol (antagonista σ) inhibió, de manera dependiente de la dosis, ambas fases del dolor inducido por formalina. No obstante, este efecto analgésico no parece deberse a un bloqueo dopaminérgico, puesto que la (-)sulpirida fue inactiva en ambas fases. De los datos de compuestos experimentales de antagonistas de receptores σ_1, administrados por vía sistémica, se dedujo que su efecto no se produce en los nociceptores periféricos sino en regiones espinales o supraespinales. Finalmente, los ratones* knockout *mostraron una menor sensibilidad al dolor inducido por la formalina, mientras que los ODN resultaron ineficaces. Estos resultados sugieren que los receptores σ_1 estarían participando en la expresión del dolor inducido por formalina, aunque no sería el único mecanismo implicado.*

Palabras clave: Formalina – Receptores σ_1 – Analgesia.

El modelo de dolor inducido por la inyección de formalina

Características generales del modelo

Generalmente se considera que el modelo de la formalina fue introducido dentro del campo del estudio del dolor por Dubuisson y Dennis,[1] hace 30 años, cuando describieron los efectos conductuales tras la inyección de una solución diluida de formalina (5%) en las patas delanteras de gatos y ratas. La formalina es una solución de formaldehído al 37% disuelto en agua. Aunque la formalina anteriormente se había utilizado como un estímulo inflamatorio y también nociceptivo,[2] no fue hasta la aparición del trabajo de estos autores cuando su uso se popularizó y extendió.[2-4] El modelo posteriormente fue desarrollado en ratones,[5-7] y aunque los efectos comportamentales se han estudiado en diferentes especies, como gatos, primates, conejos y cobayas, en-

tre otros, las ratas y los ratones han sido las más utilizadas.[2-4]

El modelo de la formalina se diferencia de la mayoría de los modelos basados en estímulos de corta duración (fásicos) y de alta intensidad en que es posible evaluar la manera en que el animal responde a un dolor moderado y continuo (tónico) generado por un daño tisular. Precisamente, esta característica ha sido la que ha incrementado su utilización y popularidad, siendo actualmente el modelo de dolor en investigación básica más utilizado. Así, algunos autores consideran que el modelo de la formalina refleja más fehacientemente algunos estados de dolor clínico que otros que utilizan estímulos mecánicos o térmicos fásicos.[2-4]

Se han publicado numerosos artículos[2-4] que han discutido y revisado varios aspectos a tener en cuenta sobre este modelo, tales como:

- El método de puntuación elegido (valores ponderados o escala categorial frente a parámetro único) o la respuesta dolorosa considerada tras la administración de la formalina, el número de pataleos frente al tiempo de lamido/mordisqueo de la pata inyectada.
- La elección de la inyección en la pata delantera o trasera, y en este último caso si es en la zona dorsal o plantar.
- El volumen y la concentración administrados.
- Otros factores, como la cepa y la especie utilizadas, la edad del animal, circunstancias ambientales como la temperatura de la habitación, el ruido o los olores, y el número de evaluadores.

Puesto que comentar todos los aspectos mencionados supera ampliamente el objetivo de este capítulo, sólo se mencionarán aquellos que resulten necesarios para la exposición de los resultados experimentales.

Por otro lado, la inyección de formalina, aparte de las respuestas comportamentales espontáneas de dolor, induce procesos que implican cambios en el sistema nervioso central, como la expresión del factor de trascripción c-Fos en las neuronas (lo cual es útil para identificar neuronas implicadas en procesos de sensibilización central) y la activación de células gliales que pueden liberar citocinas, factores de crecimiento y otros mediadores, lo que puede influir en la función neuronal y en los cambios a largo plazo.[2-4] Estos procesos, aun resultando del máximo interés, tampoco serán comentados en este capítulo puesto que trascienden su intención.

Carácter bifásico del modelo: dolor agudo y dolor tónico

La inyección intraplantar de formalina produce una respuesta dolorosa bifásica, la cual se compone de una fase temprana (primera fase), durante los primeros cinco minutos tras la inyección de la formalina, y una segunda fase tardía que comienza a los 10-15 minutos de la inyección y dura de 30 a 50 minutos. Tradicionalmente se ha considerado que la primera fase se debe a la activación directa de los nociceptores periféricos, y que la segunda es consecuencia de una respuesta inflamatoria con sensibilización de las neuronas nociceptoras de la médula espinal (sensibilización central).[2-4] Por lo tanto, el modelo de la formalina se usa normalmente como un modelo de dolor agudo y tónico.

A continuación se detallan algunos aspectos específicos para cada una de las fases, haciendo referencia también al periodo de inactividad entre ambas, conocido como "interfase".

La primera fase: dolor agudo

La primera fase tras la administración de formalina se ha propuesto que se debe a la activación directa de los nociceptores de las neuronas aferentes. Esta hipótesis se ha fundamentado en el hecho de que la inyección local de formalina dentro, o inmediatamente adyacente, del campo receptivo de nervios aislados en la pata trasera de la rata produce una activación de fibras C y Aδ en los primeros 10 minutos.[8] Además, la inyección periférica de anestésicos locales antes de la formalina produce una su-

presión total de las conductas nocifensivas de la primera fase,[9,10] así como el bloqueo de la primera fase de actividad de las neuronas multirreceptivas en la médula espinal.[11] En cuanto a los mecanismos por los cuales la formalina activa los nervios sensoriales, se ha comprobado que la administración de antagonistas de la bradicinina,[7] la serotonina y la histamina,[12,13] y de trifosfato de adenosina (ATP),[14] puede inhibir las respuestas de esta fase. Recientemente se ha demostrado que la formalina activa las neuronas sensoriales aferentes primarias mediante la acción específica y directa del receptor TRPA1, un miembro de la familia de los canales iónicos del potencial receptor transitorio o TRP (*Trasient Receptor Potential*) que está altamente expresado en una subpoblación de nociceptores de las fibras C.[15,16]

La segunda fase: dolor tónico

La segunda fase de dolor parece ser dependiente de la combinación de una reacción inflamatoria del tejido periférico y de cambios funcionales en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, la cual llega a estar sensibilizada ante estímulos nociceptivos.[17] Se ha comprobado que las respuestas conductuales son inhibidas por la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los cuales interfieren con la producción de prostaglandinas, así como por inhibidores de otros mediadores inflamatorios (bradicinina, serotonina, histamina, ATP).[7,12-14,18-21] También se ha demostrado que la administración espinal de anestésicos locales,[22] opioides,[23] antagonistas del receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA)[11,17,24] o antagonistas del receptor para la sustancia P,[25,26] inhibe las respuestas conductuales y en el asta dorsal de la médula espinal de la segunda fase cuando se administran antes, pero no después, de que se produzca la primera fase del modelo.[2-4] Esto sugiere que la actividad generada durante la fase temprana es capaz de producir cambios en la función del SNC, es decir, produce una sensibilización central, la cual a su vez afecta a los procesos ocurridos durante la fase tardía o segunda fase. Sin embargo, a este respecto hay datos contradictorios. También se considera que las respuestas de la fase 2 podrían reflejar una continua activación de aferentes sensoriales, así como los aspectos de la sensibilización central resultante de tal actividad. De este modo, se ha observado una constante actividad o disparo de fibras Aδ y C (pero no Aβ) en neuronas aisladas que inervan la pata del animal cuando se ha administrado formalina dentro de su campo receptivo o muy cerca de él.[8] Además, existen algunos trabajos en que se ha observado que la inyección periférica de anestésicos locales después de la primera fase puede suprimir completamente las conductas de la segunda,[9,27] los cambios en la tasa cardiaca y la presión sanguínea,[27] así como la activación de las neuronas convergentes (rango dinámico amplio) del asta dorsal espinal.[28] Por tanto, estos últimos resultados demuestran que ambas fases de la respuesta nociceptiva a la formalina dependen de la activación de aferentes primarios y, por consiguiente, que la segunda fase no podría ser mediada exclusivamente por la sensibilización central. En estudios llevados a cabo en ratones deficientes en el receptor TRPA1 se ha encontrado que la segunda fase se halla reducida significativamente, confirmando que este receptor media la respuesta dolorosa inducida por la formalina.[15,16]

La interfase

La interfase, el periodo que ocurre entre las dos fases de las respuestas nociceptivas (entre 5 y 15 minutos después de la inyección de formalina), no ha recibido mucha atención puesto que se ha considerado que es un periodo de inactividad. Tal conclusión fue apoyada por el hecho de que en registros de aferentes primarios se observó que la inyección de formalina en el campo receptivo produce una activación bifásica de las fibras Aδ y C, con un curso temporal paralelo a la respuesta conductual inducida por la inyección de formalina.[8,29] Sin embargo, ahora se sabe que la interfase es una fase activa que tiene un componente espinal,[30,31] en el que también participan mecanismos supraespinales.[32] El componente espinal supuestamente implica-

ría un balance entre mecanismos inhibidores y excitadores, dado que la administración espinal de antagonistas del receptor $GABA_A$[33] y de agonistas glutamatérgicos[17] reduce o suprime, respectivamente, este periodo de inactividad. En estructuras supraespinales, la interfase es abolida completamente por el corte de la unión mesencéfalo-diencéfalo.[32]

Papel de los receptores σ_1 en el dolor inducido por formalina

Antecedentes e hipótesis de trabajo

Los receptores σ presentan un perfil de sensibilidad a fármacos y una distribución en el SNC característicos,[34] y se ha descrito la existencia de al menos dos subtipos, denominados σ_1 y σ_2.[34,35] Los receptores σ_1 se han clonado en varias especies, incluido el ratón, y su secuencia no presenta homología significativa con la de ninguna otra proteína de los mamíferos.[36-38]

Los receptores σ_1 se encuentran en altas concentraciones en áreas de gran importancia para la percepción del dolor, como las láminas I y II del asta dorsal de la sustancia gris medular y la sustancia gris periacueductal.[39,40] Por otra parte, la administración de oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN) contra el receptor σ_1 del ratón aumenta la analgesia opioide mediada por los receptores μ, δ y κ, lo que sugiere la existencia de un sistema descendente σ tónicamente activo que facilita la percepción del dolor.[41]

La respuesta dolorosa a la formalina se debe en parte a la liberación de aminoácidos excitatorios en la médula espinal capaces de sensibilizar a las neuronas nociceptoras del asta dorsal de la sustancia gris medular.[17] Esto explica que dicha respuesta sea antagonizada por bloqueantes de los receptores de NMDA.[42]

Los ligandos σ modulan distintas respuestas inducidas por el NMDA, tales como la frecuencia de descarga neuronal, siendo ésta potenciada por fármacos agonistas σ_1 y antagonizada por antagonistas σ_1.[43] Por tanto, los ligandos σ podrían modificar el dolor inducido por la administración de formalina en el ratón por su capacidad de modular las respuestas mediadas por NMDA. Además, si en el SNC existe un sistema descendente σ tónicamente activo que facilita la percepción del dolor, podríamos esperar que los ratones *knockout* σ_1 y los tratados con ODN frente al receptor σ_1 mostrasen una menor sensibilidad al dolor inducido por la formalina.

Estudios experimentales

Metodología y procedimiento experimental

La metodología y el procedimiento experimental fueron muy similares en todos los estudios mencionados. Brevemente, después de estudiar el curso temporal del dolor inducido por la inyección de diferentes concentraciones de formalina (0,5% a 5%), observamos que el máximo efecto algógeno se conseguía tras la inyección intraplantar de 20 µl de formalina al 2,5% en la pata trasera del animal. El tiempo de lamido o el mordisqueo de la pata inyectada durante 45 minutos fue registrado y se consideró como indicador de la respuesta dolorosa en ratones sin tratamiento o tratados con el solvente de los fármacos. Puesto que observamos que en ambos grupos se producía una respuesta bifásica similar (Fig. 1), decidimos registrar dos periodos diferentes de lamido/mordisqueo de la pata inyectada en los animales tratados con los fármacos. El primer periodo fue registrado de 0 a 5 minutos después de la inyección de formalina y se consideró como indicador de la primera fase de dolor. El segundo periodo fue registrado desde los 15 a los 35 minutos después de la inyección de formalina y se consideró la segunda fase del modelo. Los fármacos evaluados fueron morfina y diclofenaco (como analgésicos de control sin actividad sobre los receptores σ); haloperidol y sus metabolitos I, II y III; los antagonistas σ_1 BD-1047, BD-1063 y NE-100; los agonistas σ_1 PRE-084 y (+)pentazocina; y los fármacos (-)sulpirida, (-)pentazocina y naloxona. Asimismo, se emplearon dos ODN frente al receptor σ_1. Los fármacos en estudio se administraron por vía subcutánea (s.c.) en la inmensa mayo-

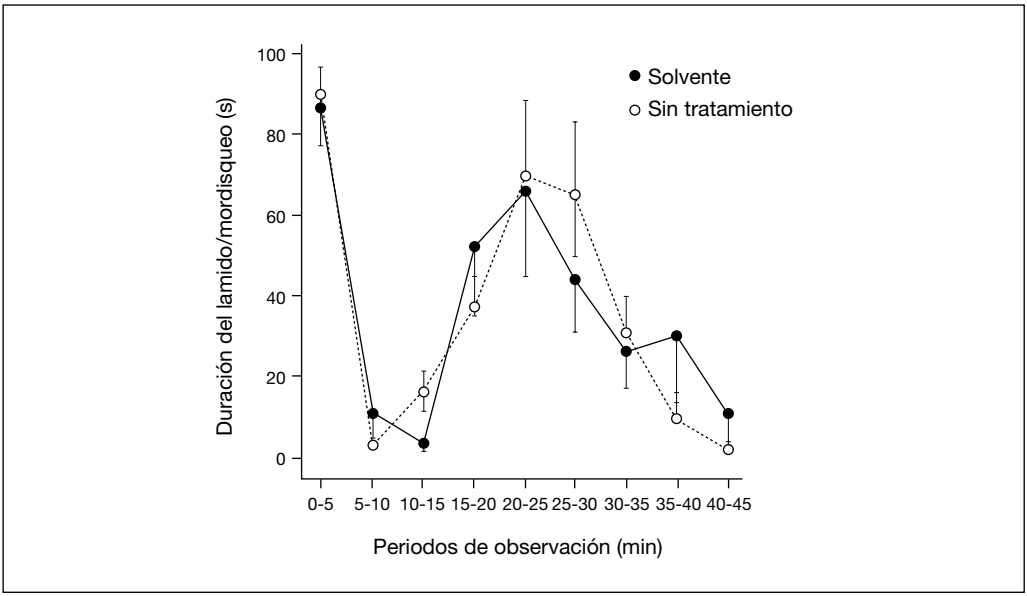


Figura 1. Curso temporal de la respuesta dolorosa (duración del lamido o mordisqueo de la pata tratada) inducida por la inyección intraplantar de formalina al 2,5% en animales sin tratamiento o tratados con el solvente de los fármacos. Cada uno de los puntos y las líneas verticales que los atraviesan representan la media ± ESM de los valores obtenidos al menos en ocho animales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en ninguno de los periodos de observación (ANOVA).

ría de los experimentos o por vía intraplantar (i.pl.) 30 minutos antes de inyectar la formalina. Respecto a la administración de los ODN frente al receptor σ_1, ésta fue por vía intracerebroventricular (i.c.v.) en un volumen de 2 µl por ratón durante cuatro días consecutivos, y el test de la formalina se realizó el quinto día. Todos los procedimientos descritos se realizaron en ratones hembra de la cepa CD-1, mientras que los estudios con ratones transgénicos (*knockout*) deficientes en receptores σ_1 se realizaron en ratones C57BL/6J. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Resultados

Caracterización del modelo

Como era de esperar y se había comprobado anteriormente, la inyección intraplantar de formalina produjo un efecto bifásico (Fig. 1), la morfina produjo un efecto analgésico dependiente de la dosis, con una potencia y eficacia similares en ambas fases del modelo, mientras que el diclofenaco sólo produjo analgesia en la segunda fase.

Estudios con antagonistas de los receptores σ_1

En primer lugar evaluamos el efecto del antipsicótico haloperidol (que actúa como antagonista σ y D_2) y de una serie de productos derivados de él que muestran afinidad exclusiva por el receptor σ_1 (metabolito I), afinidad por los receptores σ_1 y σ_2 (metabolito II) o ninguna afinidad por los receptores σ_1 y σ_2 (metabolito III)[44-47] (Tabla I). Así, comprobamos que la administración s.c. de haloperidol y de su metabolito II inhibió de forma dependiente de la dosis las dos fases del dolor inducido por la formalina, mientras que el metabolito I sólo produjo analgesia dependiente de la dosis

TABLA I. Afinidad del haloperidol, sus metabolitos y la (-)sulpirida por diferentes receptores (K_i o IC_{50}, nM).

Fármacos	σ_1*	σ_2**	D_2**
Haloperidol	5,2 ± 0,4	54 ± 10	2,8 ± 0,6
Metabolito II	12,2 ± 0,6	46 ± 6	239 ± 49
Metabolito I	243,9 ± 20	>10.000	>10.000
Metabolito III	>10.000	>10.000	>10.000
(-)Sulpirida	>10.000	>10.000	6 ± 0,9

*Los datos se han obtenido en nuestro laboratorio, en ratones.
**Estos valores proceden de varios autores y están recogidos en Cendán et al.[44]

en la segunda fase, siendo menos potente y efectivo en la primera.[44] En cambio, el metabolito III no mostró ningún efecto analgésico. Por tanto, el orden de potencia de estos fármacos para producir su efecto analgésico (haloperidol > metabolito II > metabolito I > metabolito III inactivo) se correlaciona con su afinidad por los receptores σ_1 (Tabla I y Fig. 2).[44] En cambio, los efectos analgésicos del haloperidol y su metabolitos no parecen deberse a un bloqueo dopaminérgico, ya que la (-)sulpirida (un bloqueante dopaminérgico sin afinidad por los receptores σ) fue inactiva en ambas fases (Tabla I y Fig. 2).[44] Los efectos analgésicos del haloperidol y sus metabolitos tampoco se deben a la activación directa de los receptores opioides ni a la potenciación del efecto de un sistema endógeno opioide tónicamente activo, puesto que la naloxona (un antagonista opioide) no antagonizó sus efectos analgésicos.[44]

También estudiamos los efectos de BD-1047, BD-1063 y NE-100 en este modelo y observamos que la administración s.c. de es-

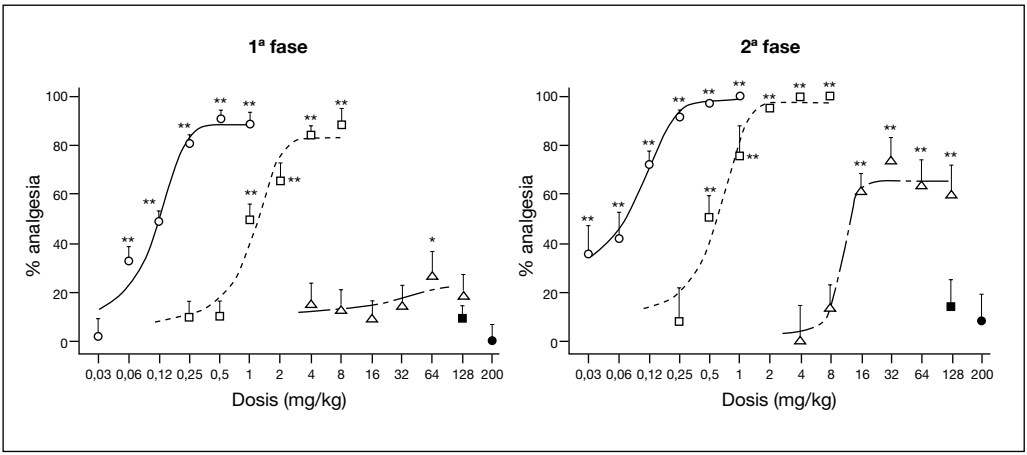


*Figura 2. Comparación del efecto analgésico inducido por la administración s.c. de haloperidol (0,03-1 mg/kg) (○), su metabolito II (0,25-8 mg/kg) (□), su metabolito I (4-128 mg/kg) (△) y su metabolito III (128 mg/kg) (■), y de (-)sulpirida (200 mg/kg) (●), en el modelo de la formalina en el ratón. Cada uno de los puntos y las líneas verticales que los atraviesan representan la media ± ESM de los valores obtenidos al menos en ocho animales por dosis. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo tratado con solvente: *p <0.05; **p <0.01 (ANOVA seguido del test de Newman Keuls).*

tos antagonistas de los receptores σ_1[45-47] produjo un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis en ambas fases de la respuesta dolorosa inducida por la inyección de formalina, siendo mayor el efecto en la segunda fase.[48] Estos resultados están en total concordancia con los obtenidos con el haloperidol y sus metabolitos.

Sin embargo, la administración local (intraplantar) de BD-1063 no tuvo ningún efecto sobre la respuesta dolorosa inducida por la inyección de formalina en la misma pata, mientras que la morfina, usada como control, inhibió ambas fases ipsilateralmente, pero no cuando fue inyectada en la pata contralateral.[49] Estos datos indican que el efecto de los antagonistas σ_1 administrados por vía sistémica no se produce en los nociceptores periféricos sino en los nociceptores situados en estructuras espinales o supraespinales, y en áreas espinales o supraespinales. De hecho, otros autores han comprobado que la administración espinal de antagonistas σ_1 bloquea las respuestas dolorosas en la segunda fase, pero no la primera, señalando la importancia de los receptores σ_1 espinales en la segunda fase del dolor inducido por formalina.[50]

Estudios con agonistas de los receptores σ_1

Como agonistas de los receptores σ_1 se emplearon (+)pentazocina y PRE-084.[45-47] Ni la administración s.c. de (+)pentazocina ni la de PRE-084 produjo efecto analgésico en ninguna de las fases. Como fármaco control de la estereoselectividad de la (+)pentazocina hacia el receptor σ_1 evaluamos varias dosis s.c. de (-)pentazocina, que muestra afinidad por el receptor opioide κ, pero no por el σ_1,[51] y como era de esperar produjo una reducción en el tiempo de lamido de la pata inyectada en ambas fases del modelo.

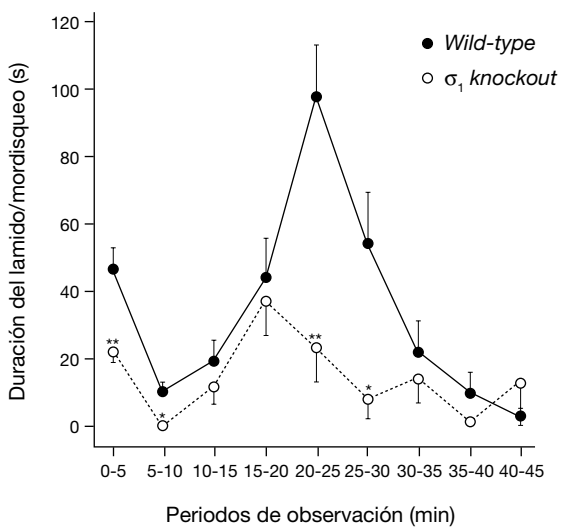


*Figura 3. Curso temporal de la respuesta dolorosa (duración del lamido o mordisqueo de la pata tratada) inducida por la inyección intraplantar de formalina al 1,25% en animales deficientes en el receptor σ_1 (*knockout*) y en animales salvajes (*wild-type*). Cada uno de los puntos y las líneas verticales que los atraviesan representan la media ± ESM de los valores obtenidos al menos en ocho animales por grupo. Diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas en los dos genotipos de ratones: *p <0.05; **p <0.01 (test de la* t *de Student).*

Estudios en animales deficientes en receptores σ_1 y tratados con ODN frente al receptor σ_1

Los datos anteriormente expuestos sugieren que el bloqueo de los receptores σ_1 podría ser una estrategia adecuada para el control de ciertos tipos de dolor tónico, y permite hipotetizar que los ratones tratados con ODN frente al receptor σ_1 mostrarían una menor sensibilidad al dolor inducido por la formalina. Los mismos resultados serían previsibles en los ratones desprovistos *(knockout)* de receptores σ_1, salvo que se desarrollen mecanismos adaptativos que compensen el déficit crónico de los receptores σ_1.

Así, cuando administramos formalina a ratones *knockout* σ_1 encontramos que la respuesta dolorosa en ambas fases se reducía en un 55%, aproximadamente, en comparación con los animales salvajes[52] (Fig. 3), y que la administración de ODN frente al receptor σ_1 no modificaba el efecto de la formalina en ninguna de las dos fases.[49] Por tanto, estos resultados en animales *knockout* σ_1 sugieren que los receptores σ_1 participan en la expresión del dolor inducido por formalina, pero que además tiene que haber otros mecanismos implicados; y la falta de eficacia de los ODN para reducir la respuesta dolorosa señalaría que los receptores σ_1 espinales son más importantes que los supraespinales.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a los miembros del grupo Neurofarmacología del Dolor, José Miguel Pujalte, Enrique Cobos, José Manuel Entrena y Francisco Nieto, así como al Dr. Enrique Portillo, su inestimable ayuda en la obtención de muchos de los datos expuestos en este capítulo. Por último, expresar mi agradecimiento al Dr. José Manuel Baeyens por sus útiles comentarios y consejos para la redacción del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. Pain. 1977;4:161-74.
2. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. Pain. 1992;51:5-17.
3. Porro CA, Cavazzuti M. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. Prog Neurobiol. 1993;41:565-607.
4. Sawynok J, Liu XJ. The formalin test: characteristics and usufulness of the model. Rev Analg. 2004;7:145-63.
5. Hunskaar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. J Neurosci Methods. 1985;14:69-76.
6. Murray CW, Porreca F, Cowan A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. J Pharmacol Methods. 1988;20:175-86.
7. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. Pain. 1989;38:347-52.
8. Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. Pain. 1996;64:345-55.
9. Dallel R, Raboisson P, Clavelou P, Saade M, Woda A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. Pain. 1995;61:11-6.
10. Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. Psychopharmacology (Berl). 1991;104:35-44.
11. Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. Brain Res. 1990;518:218-26.
12. Doak GJ, Sawynok J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. Neuroscience. 1997;80:939-49.
13. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. Neuroscience. 2001;102:937-44.
14. Jarvis MF, Wismer CT, Schweitzer E, Yu H, van Biesen T, Lynch KJ, et al. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X(3) allosteric modulator, cibacron blue. Br J Pharmacol. 2001;132:259-69.

15. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:13525-30.
16. Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S, et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. J Neurosci. 2007;27:11412-5.
17. Coderre TJ, Melzack R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. J Neurosci. 1992;12:3665-70.
18. Abbott FV, Hong Y, Blier P. Activation of 5-HT2A receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. Neuropharmacology. 1996;35:99-110.
19. Chapman V, Dickenson AH. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. Eur J Pharmacol. 1992;219:427-33.
20. Correa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. Br J Pharmacol. 1993;110:193-8.
21. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain. 1987;30:103-14.
22. Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. Brain Res. 1990;535:155-8.
23. Dickenson AH, Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. Pain. 1987;30:349-60.
24. Yamamoto T, Yaksh TL. Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. Anesthesiology. 1992;77:757-63.
25. Murray CW, Cowan A, Larson AA. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic acid antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model. Pain. 1991;44:179-85.
26. Yamamoto T, Yaksh TL. Stereospecific effects of a nonpeptidic NK1 selective antagonist, CP-96,345: antinociception in the absence of motor dysfunction. Life Sci. 1991;49:1955-63.
27. Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. J Neurosci. 1995;15:7575-84.
28. Dickenson AH, Sullivan AF. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. Neurosci Lett. 1987;83:207-11.
29. McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. Neurosci Lett. 1996;208:45-8.
30. Coderre TJ, Yashpal K, Henry JL. Specific contribution of lumbar spinal mechanisms to persistent nociceptive responses in the formalin test. Neuroreport. 1994;5:1337-40.
31. Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, Coderre TJ. Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. Pain. 1999;82:57-63.
32. Matthies BK, Franklin KB. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. Pain. 1992;51:199-206.
33. Kaneko M, Hammond DL. Role of spinal γ-aminobutyric acid$_A$ receptors in formalin-induced nociception in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 1997;282:928-38.
34. Walker JM, Bowen WD, Walker FO, Matsumoto RR, De Costa B, Rice KC. Sigma receptors: biology and function. Pharmacol Rev. 1990;42:355-402.
35. Guitart X, Codony X, Monroy X. Sigma receptors: biology and therapeutic potential. Psychopharmacology (Berl). 2004;174:301-19.
36. Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, et al. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:8072-7.
37. Seth P, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and structural analysis of the cDNA and the gene encoding the murine type 1 sigma receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1997;241:535-40.
38. Pan YX, Mei J, Xu J, Wan BL, Zuckerman A, Pasternak GW. Cloning and characterization of a mouse σ_1 receptor. J Neurochem. 1998;70:2279-85.
39. Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoal M, et al. Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. Neuroscience. 2000;97:155-70.
40. Kitaichi K, Chabot JG, Moebius FF, Flandorfer A, Glossmann H, Quirion R. Expression of the purported sigma$_1$ (σ_1) receptor in the mammalian brain and its possible relevance in deficits induced by antagonism of the NMDA receptor complex as revealed using an antisense strategy. J Chem Neuroanat. 2000;20:375-87.

41. Mei J, Pasternak GW. σ_1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. J Pharmacol Exp Ther. 2002;300:1070-4.
42. Chaplan SR, Malmberg AB, Yaksh TL. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 1997;280:829-38.
43. Monnet FP, Debonnel G, Bergeron R, Gronier B, De Montigny C. The effects of sigma ligands and of neuropeptide Y on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation of CA_3 dorsal hippocampus neurones are differentially affected by pertussin toxin. Br J Pharmacol. 1994;112:709-15.
44. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Baeyens JM. Antinociceptive effects of haloperidol and its metabolites in the formalin test in mice. Psychopharmacology (Berl). 2005;182:485-93.
45. Cobos EJ, Baeyens JM, Del Pozo E. Phenytoin differentially modulates the affinity of agonist and antagonist ligands for σ_1 receptors of guinea pig brain. Synapse. 2005;55:192-5.
46. Cobos EJ, Lucena G, Baeyens JM, Del Pozo E. Differences in the allosteric modulation by phenytoin of the binding properties of the σ_1 ligands [^{3}H](+)-pentazocine and [^{3}H]NE-100. Synapse. 2006;59:152-61.
47. Cobos EJ, Del Pozo E, Baeyens JM. Irreversible blockade of sigma-1 receptors by haloperidol and its metabolites in guinea pig brain and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. J Neurochem. 2007;102:812-25.
48. Pujalte JM, Cendán CM, Baeyens JM. Antinociceptive effects of σ_1 receptor antagonists in the formalin test. Meth Find Exp Clin Pharmacol. 2002;24:111.
49. Kroner A, Arce A, Nieto FR, Cendán CM, Pujalte JM, Baeyens JM. Effects of σ receptor ligands and σ_1 receptor antisense oligodeoxynucleotides in the formalin test in mice. Meth Find Exp Clin Pharmacol. 2004;26:129.
50. Kim HW, Kwon YB, Roh DH, Yoon SY, Han HJ, Kim KW, et al. Intrathecal treatment with σ_1 receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice. Br J Pharmacol. 2006;148:490-8.
51. Chien CC, Pasternak GW. (-)-Pentazocine analgesia in mice: interactions with a sigma receptor system. Eur J Pharmacol. 1995;294:303-8.
52. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Montoliu L, Baeyens JM. Formalin-induced pain is reduced in σ_1 receptor knockout mice. Eur J Pharmacol. 2005;511:73-4.

DISCUSIÓN

M.J. Sanz: Respecto a la potenciación observada entre antagonistas σ_1 y morfina, ¿habéis probado combinar dosis subóptimas de morfina y haloperidol para conseguir un mayor efecto inhibitorio?

J.M. Baeyens: Sí, pero en el modelo de retirada de la cola (*tail flick*), no en el de la formalina. Utilizamos dosis de morfina de 1 mg/kg, que prácticamente no tienen efecto analgésico, junto con dosis muy bajas de haloperidol, y observamos la potenciación.

M.J. Sanz: Respecto a los oligonucleótidos antisentido, no he visto casi ningún modelo que haya funcionado, por su dificultad, porque son sustancias muy solubles…

C.M. Cendán: En el modelo de la formalina no han mostrado buenos resultados. Sin embargo, en alodinia mecánica inducida por capsaicina han sido muy efectivos.

M.J. Sanz: ¿Cómo penetran en la célula? ¿Mediante liposomas?

C.M. Cendán: Mediante una inyección intracerebroventricular.

A.M. Planas: ¿Evaluásteis si la concentración de proteína estaba reducida para verificar que los oligodesoxinucleótidos hubiesen funcionado?

C.M. Cendán: No, porque otros autores ya lo habían demostrado previamente utilizando los mismos oligodesoxinucleótidos a las mismas dosis. Al ser efectivos en otros modelos, las diferencias observadas tenían que deberse al modelo de la formalina.

Modelos animales de dolor neuropático: dolor inducido por antitumorales frente a manipulación de nervios periféricos

C. Goicoechea
Área de Farmacología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Madrid.

Resumen: *En investigación básica disponemos de algunos modelos para estudiar el dolor neuropático y su tratamiento farmacológico; entre ellos, por su frecuente uso, destacan la manipulación quirúrgica de los nervios espinales, una aproximación desarrollada a finales del siglo XX, y la administración de agentes químicos (antibióticos, antitumorales), desarrollada a principios de este siglo y derivada directamente de la observación clínica, ya que está demostrado que el uso de estos fármacos puede provocar neuropatías periféricas en los pacientes. Si bien muchos de los avances más importantes en el conocimiento del dolor neuropático se han debido al uso del modelo de ligadura del nervio ciático (alteraciones de la concentración de algunos neurotransmisores o activación de células gliales, por ejemplo), en la actualidad los modelos basados en el uso de agentes antineoplásicos están ganando aceptación entre la comunidad científica, en parte por su correlación con la clínica humana. La comparación entre ambos modelos demuestra que las modificaciones que se producen en situaciones de daño nervioso son semejantes a corto y medio plazo (modificaciones en la inervación periférica, liberación de sustancias proinflamatorias...), que ambos son modelos útiles porque nos permiten mejorar nuestro conocimiento sobre el origen y el desarrollo del dolor neuropático, así como el desarrollo de fármacos específicos, y que tal vez puedan suministrarnos datos objetivos para seleccionar el modelo más adecuado para estudiar distintos tipos de dolor neuropático.*

Palabras clave: Dolor neuropático – Antitumorales – Ligadura del nervio ciático – Cannabinoides – Rata.

Introducción

El dolor, "una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular evidente o probable, o descrita en términos coincidentes con esa lesión" (según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor),[1] actúa indudablemente como sistema de alarma, y de su correcto funcionamiento depende la integridad del organismo. Sin embargo, cuando el dolor se cronifica pierde su sentido protector y se convierte en una situación clínica *per se*, provocando además en el paciente sensaciones de estrés, ansiedad e incluso sufrimiento.

De los distintos tipos de dolor crónico, uno de los más problemáticos es el dolor neuropático, que se define como un dolor originado por una lesión nerviosa o disfunción del sistema nervioso central. Aunque afortunadamente presenta una baja incidencia con respecto al total de situaciones de dolor crónico, respon-

de muy mal al tratamiento farmacológico habitual porque no siempre es posible identificar dicha lesión o disfunción,[1] o porque no es posible conocer su etiología. Por ello, el diseño de modelos animales para poder estudiar este tipo de dolor ha sido muy complicado, y sólo recientemente se ha podido empezar a estudiar en el laboratorio.

Aunque existen diferentes aproximaciones experimentales para el estudio del dolor neuropático, nos centraremos en dos modelos de inducción de neuropatía periférica en roedores: la manipulación de los nervios periféricos y la administración de antitumorales. Sin embargo, no son los únicos en imitar una situación de dolor crónico y existen otras posibilidades, como el desarrollo de neuropatía diabética por administración de estreptozotocina en ratas,[2] o las lesiones centrales por administración de un agente químico,[3] aunque estos modelos son menos empleados, en general por la elevada incidencia de modificaciones fisiológicas y conductuales que presentan y que complican considerablemente la valoración de la nocicepción en el laboratorio.

Modelo de la ligadura del nervio ciático

Aunque ya se habían desarrollado previamente modelos de dolor neuropático en animales mediante la sección de troncos nerviosos,[4] el gran avance en el estudio de las neuropatías periféricas se produce gracias al modelo propuesto por Bennet y Xie en 1988.[5] Consiste en aislar el nervio ciático en la zona próxima a la trifurcación y realizar tres ligaduras a su alrededor con hilo catgut crómico, no reabsorbible, con aproximadamente 1 mm de separación entre ellas. Las ligaduras se realizan cuidadosamente para constreñir el nervio, disminuyendo, pero no impidiendo, la circulación sanguínea a través de la vasculatura epidural superficial. Aunque se manifiestan signos a partir de la semana, como por ejemplo conductas de protección de la pata operada, los efectos más significativos aparecen al cabo de 5 a 10 días y, según los diseñadores del modelo, se mantienen al menos tres meses.[5] Entre los parámetros más interesantes para valorar la neuropatía figuran la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica, ya que ambas son situaciones muy frecuentes en la clínica humana. Han aparecido distintas variaciones del modelo original, que incluyen ligaduras parciales del nervio ciático[6] o ligaduras de otros nervios espinales,[7] que aportan pequeñas diferencias funcionales al modelo de Bennet y Xie.

Para determinar la aparición y el grado de evolución de la hipersensibilidad al dolor (hiperalgesia o alodinia) propia de los modelos de neuropatía periférica, se suelen utilizar dos pruebas de nocicepción: el estímulo térmico de la pata trasera (*plantar test*),[8] para valorar la hiperalgesia térmica, y la utilización de filamentos calibrados en la planta de las patas (test de Von Frey),[9] para valorar la alodinia mecánica.

El *plantar test* consiste en un dispositivo que emite un foco calórico de intensidad regulable hacia la superficie plantar del animal. La intensidad del foco térmico se ajusta para un tiempo de latencia control (tiempo de retirada de la pata trasera) de 8-10 segundos, y se establece un tiempo de corte de 30 segundos. La utilidad de este test, en el modelo de la ligadura del ciático, radica en la posibilidad de tener en el mismo animal una respuesta basal, o control (la pata contraleteral, no operada), y una respuesta a la lesión (la pata ipsilateral, lesionada), de forma que disminuye la influencia de la variabilidad interindividual. Generalmente, las patas traseras se someten al test de forma alternativa, con un intervalo de 1,5-2 minutos entre cada medida. Se suelen realizar tres medidas de cada pata en cada sesión, tomando como valor la media de las tres.

Para la valoración de la alodinia mecánica, generalmente se utilizan los filamentos de Von Frey (calibrados entre 0,9 y 40 g), que se aplican en la superficie plantar de las patas traseras. Estos filamentos son de nailon y están calibrados para ejercer una presión determinada en la pata. Se valora la fuerza que es necesario aplicar para obtener una retirada o movimiento reflejo de la pata de la rata. Se presiona la superficie plantar de ambas patas

traseras, de forma alternativa, con los distintos filamentos de nailon, en orden creciente de presión (desde 0,9 hasta 40 g). Cada medida se repite cinco veces con un intervalo de 1-2 segundos. Si no se obtiene respuesta con el filamento aplicado, el proceso se repite con la siguiente fibra de mayor fuerza, considerando como umbral de respuesta la fuerza que ejerce el primer filamento que produce una respuesta positiva en al menos tres de los cinco estímulos.

Modelo por administración de antitumorales

La introducción en la clínica de agentes antitumorales como la vincristina, el cisplatino o más recientemente el paclitaxel, se vio acompañada, como efecto indeseable de su utilización, de la aparición de neuropatías periféricas, cuyo establecimiento es con frecuencia motivo de interrupción de la terapia por parte del paciente.

La comprobación de que la administración de estos fármacos a roedores provoca la aparición de conductas nociceptivas, hiperalgésicas y alodínicas similares a las observadas en el paciente,[10] ha convertido a este modelo en una alternativa muy popular para el estudio del dolor neuropático, ya que ofrece la posibilidad de recrear en el laboratorio una situación casi idéntica a la ocurrida en la clínica humana.

Aunque puede llevarse a cabo con diversos agentes citotóxicos, nos centraremos en la descripción y el estudio del modelo por administración de paclitaxel. Se administra paclitaxel (1 mg/kg) a las ratas por vía intraperitoneal (i.p.) en cuatro días alternativos (días 1, 3, 5 y 7), con un volumen de inyección de 1 ml.[10] La dosis acumulada final de paclitaxel es de 4,0 mg/kg.

Se observa el comportamiento espontáneo de las ratas y se controla la evolución del peso corporal antes del tratamiento y durante tres semanas después de la primera administración de paclitaxel o vehículo. Se ha descrito una duración de la neuropatía de al menos 35 días.[10] Para valorar la aparición de neuropatía periférica bilateral se utilizan las mismas pruebas que para el modelo de la ligadura: el *plantar test* y el modelo de filamentos de Von Frey.

Se han descrito pequeñas diferencias en función del agente antineoplásico utilizado, y así, por ejemplo, la administración de paclitaxel no provoca la aparición de dolor espontáneo, y la hiperalgesia térmica es menos evidente en el modelo de administración de cisplatino.[11]

Valoración de la neuropatía periférica inducida por ambos modelos: cambios en la conducta, alteraciones ultraestructurales y respuesta farmacológica

Cambios conductuales

La ligadura del nervio ciático en la rata provoca una alodinia mecánica y una hiperalgesia al calor evidentes a los 14 días de la realización de la cirugía. El desarrollo de neuropatía es unilateral, con una diferencia de sensibilidad al estímulo (tanto térmico como mecánico) estadísticamente significativa al comparar la respuesta en ambas patas traseras (Fig. 1).

Con el modelo de neuropatía por administración de paclitaxel se obtienen resultados similares. En este caso la neuropatía es bilateral, se manifiesta a partir de los siete días y se mantiene, en nuestras condiciones experimentales, al menos 30 días (Fig. 2).[12]

Alteraciones ultraestructurales

Existen pruebas de las modificaciones provocadas por los modelos animales de dolor neuropático, y muchas de ellas guardan paralelismo con lo evidenciado en la clínica humana. En la rata se han descrito alteraciones en la inervación de la piel tras la ligadura de los nervios periféricos, con aparición de fibras autónomas;[13] en situaciones de dolor crónico en humanos, la modulación farmacológica de las fibras autónomas es una estrategia terapéutica, ya que está comprobada su participación

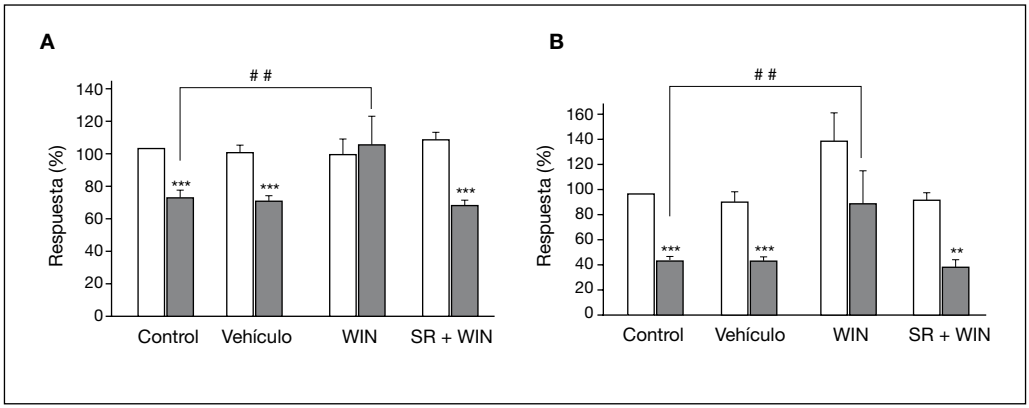


*Figura 1. Valoración de la hiperalgesia (A) y la alodinia mecánica (B) en ratas con ligadura del nervio ciático, a los 14 días de la operación. Las barras muestran la media ± error estándar de la media de los porcentajes de respuesta frente al control obtenidos en grupos de 12 animales. Las barras blancas muestran la respuesta en la pata control y las barras negras en la pata operada. Vehículo = grupos tratados con el vehículo de los cannabinoides; WIN = grupos tratados con 1,5 mg/kg, i.p. de WIN; SR+WIN = grupos tratados con el antagonista SR (1 mg/kg, i.p.) y WIN (1 mg/kg, i.p.). **p < 0.01, ***p <0.001 frente a pata control, ##p <0.01 frente a pata contralateral.*

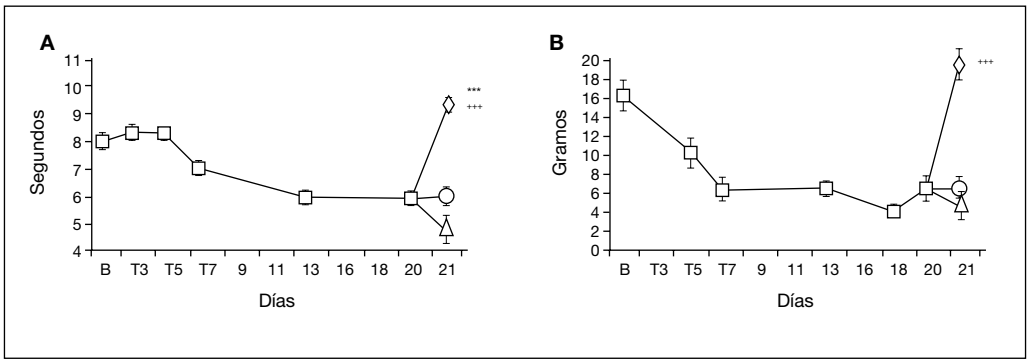


*Figura 2. Valoración de la hiperalgesia (A) y la alodinia mecánica (B) en ratas antes (día B), durante (T3-T7) y después del tratamiento con pacilitaxel. Los cuadrados muestran la media ± error estándar de la media de los valores obtenidos en todos los grupos de 12 animales. El rombo muestra la respuesta del grupo tratado el día 21 con WIN 1,5 mg/kg i.p.; el círculo la respuesta del grupo tratado con el vehículo del WIN; el triángulo la respuesta del grupo tratado con el antagonista SR1 (1 mg/kg i.p.) y con WIN (1,5 mg/kg i.p.). ***p <0.001 frente a día B; +++p <0.001 frente a día 20.*

en el mantenimiento del dolor crónico. Otro ejemplo es que el modelo de la ligadura del nervio ciático provoca un aumento de la sensibilidad mecánica en zonas cutáneas próximas a la lesión, pero fuera del territorio inervado por el nervio ciático; esta situación se correlaciona fácilmente con las situaciones de dolor extraterritorial que mencionan frecuentemente los pacientes con dolor neuropático.[14-16] La existencia de este tipo de coincidencias permite aventurar que otras modificaciones halladas en el modelo animal podrían también estar presentes en los pacientes aquejados de dolor neuropático. Así, por ejemplo, en el modelo de la ligadura del nervio ciático, se sabe que una de las causas del inicio y el mantenimiento del dolor crónico

es la activación de las células gliales, en particular de la microglía.[17] Éstas liberan una serie de factores pronociceptivos[18,19] que van a favorecer la cronificación del dolor, en particular citocinas proinflamatorias (pero también antiinflamatorias). Esta evidencia ha permitido, por ejemplo, revertir la neuropatía por ligadura del ciático mediante la administración intratecal de interleucina 10, una citocina antiinflamatoria,[20] o de minociclina, una tetraciclina que inactiva la microglía.[21]

En el modelo de neuropatía periférica inducida por paclitaxel y otros quimioterápicos no se han hallado modificaciones importantes en la inervación periférica. Hasta el momento sólo se han descrito pequeñas e inconsistentes alteraciones en los microtúbulos y edema endoneural,[10] y no hay alteraciones de importancia en la conducción de la señal eléctrica en las fibras mielínicas.[22] Tampoco existen modificaciones en marcadores clásicamente alterados en situaciones de dolor neuropático, como el factor de crecimiento nervioso (NGF),[22] y sólo últimamente se ha propuesto la existencia de alteraciones en las mitocondrias de las células nerviosas como una posible justificación de la neuropatía.[23] Recientemente, de forma similar a lo acontecido con el modelo de ligadura del nervio ciático, se ha demostrado que la administración intravenosa de paclitaxel o vincristina favorece la activación de las células gliales y el aumento del número de macrófagos.[24] Para comprobar si el aumento de la reactividad glial está también implicado en el mantenimiento del dolor neuropático en el modelo de paclitaxel, decidimos administrar minociclina durante 14 días, desde el inicio del tratamiento con paclitaxel. Este tratamiento evitó la aparición de la neuropatía periférica, evaluada como desarrollo de hiperalgesia y alodinia (Fig. 3), lo cual sugiere que los fenómenos de hiperreactividad microglial que aparecen en el modelo de ligadura del nervio ciático se producen igualmente en el modelo de paclitaxel.

Modulación farmacológica

Como se ha comentado, el tratamiento farmacológico del dolor neuropático dista mucho de estar bien establecido, ya que con frecuencia los fármacos más eficaces en otros modelos de dolor crónico, como los opioides, son incapaces de aliviar el dolor. Frecuentemente se recurre a tratamientos con los llamados fármacos coadyuvantes, como los antidepresivos o los anticonvulsivantes.

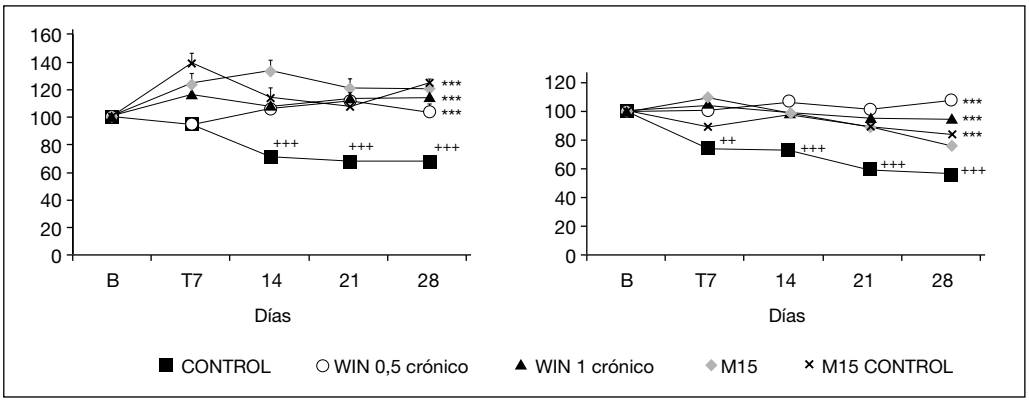


*Figura 3. Efecto del tratamiento crónico diario con WIN (0,5 y 1 mg/kg i.p.) o minociclina (M15; 15 mg/kg i.p.), durante los primeros 14 días, sobre la hiperalgesia (A) y la alodinia mecánica (B) en ratas tratadas con paclitaxel. Las líneas muestran la media ± error estándar de la media de los valores obtenidos en grupos de 12 animales. B indica los valores basales antes del tratamiento con paclitaxel; T7 indica el último día de tratamiento con paclitaxel; 14, 21 y 28 se refieren a los días tras el inicio del tratamiento con paclitaxel. ***p <0.001 frente a grupo control; ++p <0.01; +++p <0.001 frente a día B.*

Aparte de su aportación al estudio de las modificaciones asociadas al dolor crónico, los modelos de dolor neuropático han permitido profundizar en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de este tipo de situaciones. Se ha descrito una buena correlación entre los efectos analgésicos obtenidos en modelos animales de dolor neuropático y la respuesta en clínica humana,[25] lo que permite utilizarlos como modelos de predicción de la respuesta a fármacos (con las limitaciones propias de todos los modelos animales, evidentemente).

En los últimos años se han incorporado al grupo de fármacos analgésicos coadyuvantes los cannabinoides, un conjunto de fármacos derivados del Δ^9-tetrahidrocannabinol (THC), que presentan un buen perfil analgésico[26-28] y que han empezado a utilizarse para algunos dolores crónicos. Por ejemplo, en Canadá está comercializado *Sativex*, una mezcla de THC y cannabidiol (ambos alcaloides de la planta *Cannabis sativa*), para el tratamiento del dolor neuropático en pacientes con esclerosis múltiple. El estudio del sistema endocannabinoide y su participación en el dolor crónico ofrece, por lo tanto, la posibilidad de desarrollar nuevos fármacos eficaces para el tratamiento de estas situaciones.

Nuestro grupo tiene en marcha una línea de investigación sobre el papel de los fármacos cannabinoides en el tratamiento del dolor crónico experimental en roedores. Para valorar el efecto de los agonistas cannabinoides sobre la neuropatía periférica se realizaron dos aproximaciones experimentales: la valoración del efecto agudo del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre los signos de la neuropatía en ambos modelos experimentales, y la posible prevención del desarrollo de dicha neuropatía con un tratamiento crónico con cannabinoides en el modelo de neuropatía por paclitaxel.

Efecto de la administración aguda del agonista cannabinoide WIN 55,212-2

Aunque el efecto agudo de WIN en la ligadura del nervio ciático ya había sido evaluado previamente por otros autores,[29] nuestro grupo fue el primero en comparar la respuesta del agonista cannabinoide en ambos modelos.[12] Para ello se administró una dosis de WIN de 1,5 mg/kg, por vía i.p., al día siguiente de la última valoración (día 21 en el grupo tratado con paclitaxel y día 14 en el modelo de la ligadura). La administración del agonista cannabinoide WIN revirtió tanto la hiperalgesia como la alodinia mecánica en ambos modelos. Este efecto fue bloqueado por la administración previa de SR141716A, un antagonista cannabinoide selectivo de los receptores CB1 (Figs. 1 y 2).

Intentando analizar el mecanismo de acción de los cannabinoides en ambos modelos, procedimos a administrar el agonista WIN (50, 100 y 250 µg) por una vía tópica, como es la administración intraplantar.

En ninguno de los dos modelos estudiados se encontraron diferencias entre la respuesta de la pata en que se administró WIN y la pata "no tratada" (Figs. 4 y 5), lo que demuestra el efecto antinociceptivo sistémico del agonista cannabinoide y descarta diferencias en el efecto del fármaco en función del modelo experimental.

Efecto de la administración crónica del agonista cannabinoide WIN 55,212-2

Puesto que el efecto del WIN no se debía a una acción periférica, decidimos estudiar el efecto de su administración crónica durante el establecimiento de la neuropatía inducida por paclitaxel. En este caso se administró una vez al día (0,5 y 1 mg/kg, i.p.), durante los primeros 14 días, y a las dos dosis estudiadas consiguió prevenir el desarrollo de la neuropatía periférica en el modelo de paclitaxel, manteniendo en valores control los umbrales de respuesta a la estimulación, tanto térmica como mecánica, desde el mismo momento de inicio del protocolo experimental (Fig. 3), de forma similar a lo ocurrido con el tratamiento previo con minociclina.

Conclusiones

La aparición, en los últimos años, de modelos experimentales válidos para estudiar

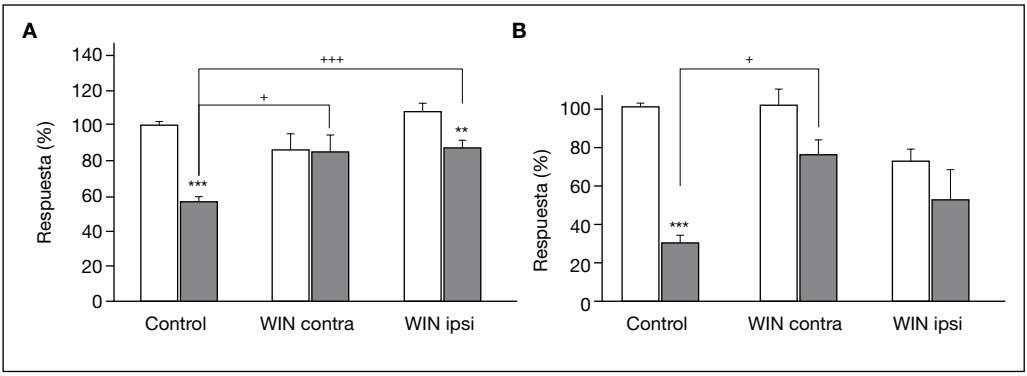


*Figura 4. Efecto de WIN intraplantar (i.pl.) sobre la hiperalgesia (A) y la alodinia mecánica (B) en ratas con ligadura del nervio ciático. Las barras muestran la media ± error estándar de la media de los porcentajes de respuesta frente al control obtenidos en grupos de 12 animales. Las barras blancas muestran la respuesta en la pata control y las barras negras en la pata operada. WIN ipsi= grupo tratado con 250 µg i.pl. en la pata operada; WIN contra = grupo tratado con 250 µg i.pl. en la pata control. **p <0.01; ***p <0.001 frente a pata contralateral; $^{+}$p <0.05; $^{+++}$p <0.001 frente a pata ipsilateral.*

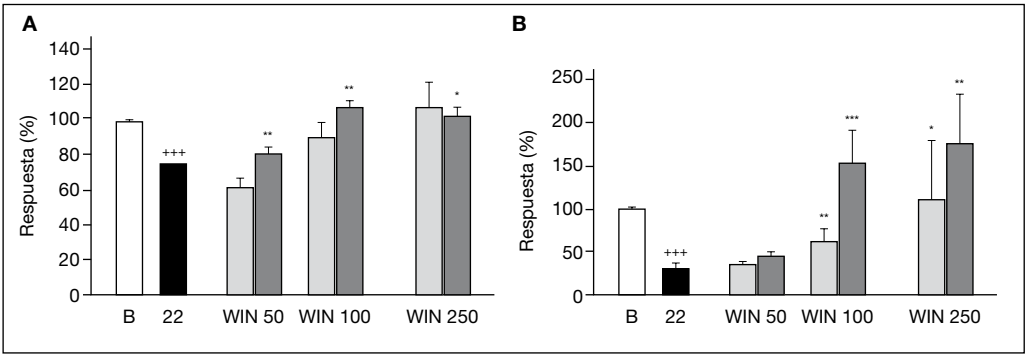


*Figura 5. Efecto de WIN intraplantar (i.pl.) sobre la hiperalgesia (A) y la alodinia mecánica (B) en ratas tratadas con paclitaxel. Las barras muestran la media ± error estándar de la media de los valores obtenidos en grupos de 12 animales. B indica los valores basales antes del tratamiento con paclitaxel; 22 indica los valores el día previo a la administración de WIN. Las barras con rayas horizontales indican el efecto en la misma pata en que se administra WIN (50, 100 y 250 µg); las barras con rayas verticales los valores medidos en la pata contralateral. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001 frente a día 22; $^{+++}$p <0.001 frente a día B.*

el dolor neuropático en sus distintas facetas (génesis, evolución, modulación farmacológica) abre un amplio campo de trabajo y ofrece atractivas expectativas clínicas.

La comparación de las dos aproximaciones experimentales más empleadas en el laboratorio para inducir dolor neuropático, el modelo de la ligadura del nervio ciático y el modelo de administración de antitumorales, demuestra la existencia de importantes similitudes tanto en el desarrollo y la evolución temporal de la neuropatía como en las modificaciones ultraestructurales que la acompañan, e incluso en su idoneidad para la valoración de estrategias farmacológicas.

Ambos modelos muestran ventajas e inconvenientes a la hora de su utilización en el laboratorio. El modelo de la ligadura del nervio

ciático requiere cierta habilidad manual y experiencia práctica, mientras que el modelo de administración de antitumorales es sencillo y fácilmente reproducible, y aunque este último es más caro (ni el paclitaxel ni la vincristina son precisamente baratos) prácticamente no existen fallos atribuibles al método, lo que siempre puede ocurrir cuando se emplea un procedimiento quirúrgico como la ligadura del nervio ciático.

Por todo ello, actualmente no hay datos suficientes que permitan seleccionar un modelo u otro en función del tipo de estudio que se quiera realizar, y no hay una técnica que pueda predecir una respuesta farmacológica determinada, ya que la evolución clínica de las situaciones de dolor neuropático no son predecibles ni constantes. Sin embargo, la gran cantidad de información que se está obteniendo gracias a los distintos modelos utilizados en investigación básica permitirán, así lo esperamos al menos, que en un plazo razonable se puedan obtener nuevos modelos, o perfeccionar los ya existentes, para lograr un buen conocimiento y, lo que es más importante, un adecuado tratamiento del dolor neuropático.

BIBLIOGRAFÍA

1. IASP Task Force on Taxonomy. Part III: Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. En: Merskey H, Bogduk N, editors. Classification of chronic pain, 2nd ed. Seattle: IASP Press; 1994. p. 209-14.
2. Ahlgren SC, Levine JD. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. Neuroscience. 1993;52:1049-55.
3. Yezierski RP, Park SH. The mechanosensitivity of spinal sensory neurons following intraspinal injections of quisqualic acid in the rat. Neurosci Lett. 1993;157:115-9.
4. Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, et al. Autotomy following peripheral nerve lesions. Experimental anesthesia dolorosa. Pain. 1979;7:103-13.
5. Bennett G, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain. 1988;33:87-107.
6. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain. 1990;43:205-18.
7. Kim S, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain. 1992;50:355-63.
8. Hargreaves KM, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain. 1988;32:77-88.
9. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods. 1994;53:55-63.
10. Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennett GJ. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. Pain. 2001;94:293-304.
11. Vera G, Chiarlone A, Cabezos PA, Pascual D, Martín MI, Abalo R. WIN 55,212-2 prevents mechanical allodynia but not alterations in feeding behaviour induced by chronic cisplatin in the rat. Life Sci. 2007;81:468-79.
12. Pascual D, Goicoechea C, Suardiaz M, Martín MI. A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. Pain. 2005;118: 23-34.
13. Grelik C, Bennett GJ, Ribeiro da Silva A. Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. Eur J Neurosci. 2005;21:2475-87.
14. Ochoa JL, Yarnitsky D. Mechanical hyperalgesias in neuropathic pain patients: dynamic and static subtypes. Ann Neurol. 1993;33:465-72.
15. Baron R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. Clin J Pain. 2000;16(2 Suppl):S12-20.
16. Jensen TS, Gottrup H, Sindrup SH, Bach FW. The clinical picture of neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 2001;429:1-11.
17. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. Trends Neurosci. 2001;24:450-5.
18. Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. Nat Rev Neurosci. 2005;6:521-32.
19. Tsuda M, Inoue K, Salter MW Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in “small” glia. Trends Neurosci. 2005;28:101-7.

20. Milligan ED, Langer SJ, Sloane EM, He L, Wieseler-Frank J, O'Connor K, et al. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. Eur J Neurosci. 2005;21:2136-48.
21. Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. Pain. 2005;115:71-83.
22. Persohn E, Canta A, Schoepfer S, Traebert M, Mueller L, Gilardini A, et al. Morphological and morphometric analysis of paclitaxel and docetaxel-induced peripheral neuropathy in rats. Eur J Cancer. 2005;41:1460-6.
23. Flatters SJ, Bennett GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. Pain. 2006;122:245-57.
24. Peters CM, Jiménez-Andrade JM, Jonas BM, Sevcik MA, Koewler NJ, Ghilardi JR, et al. Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. Exp Neurol. 2007;203:42-54.
25. Bennett, GJ. Animal models of neuropathic pain and its treatment. The Fifth International Conference on the Mechanisms and Treatment of Neuropathic Pain, 2002. Disponible en: http://www.neuropathicpain.org/SUMMARY/home.htm (consultado el 28 de noviembre de 2007).
26. Jhaveri MD, Sagar DR, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V. Cannabinoid CB2 receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. Mol Neurobiol. 2007;36:26-35.
27. Liang YC, Huang CC, Hsu KS. The synthetic cannabinoids attenuate allodynia and hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. Neuropharmacology. 2007;53:169-77.
28. Ware M, Beaulieu P. Cannabinoids for the treatment of pain: An update on recent clinical trials. Pain Res Manag. 2005;10(Suppl A):27A-30A.
29. Herzberg U, Eliav E, Bennett GJ, Kopin IJ. The analgesic effects of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain. Neurosci Lett. 1997;221:157-60.

DISCUSIÓN

A.M. Planas: ¿Observáis diferencias temporales en la respuesta de los astrocitos y de la microglía?

C. Goicoechea: En el dolor neuropático primero se produce reactividad microglial y luego una activación de los astrocitos. Dado que la minociclina bloquea la microglía y no actúa sobre los astrocitos, nos llamó la atención observar una modificación de la actividad de los astrocitos. Suponemos que al administar minociclina durante 15 días, la acción sobre la microglía acaba repercutiendo sobre los astrocitos.

M.I. Colado: ¿Por qué elegisteis el modelo de ligadura del ciático en lugar de la denervación directa del ciático? ¿Observáis autotomía en este modelo?

C. Goicoechea: La principal crítica de los modelos de ligadura fuerte del nervio ciático era que producía incapacidad motora de la pata. Por un lado conllevaba cuestiones éticas y, por otro lado, no respondía a las necesidades de los clínicos porque los pacientes pueden mover el brazo, no lo tienen inmovilizado. El modelo propuesto por Bennett y Xie, en vez de atar o seccionar el nervio, se basa en provocar una neuroinflamación y una degeneración de los axones que afectan la movilidad de la pata, pero sin producir autotomía.

A.G. Fernández: Me han sorprendido gratamente, en tus resultados, los bajos valores que muestran las medidas de dispersión, lo que sugiere una gran robustez del modelo en un campo como es el dolor, caracterizado por una amplia variación en la respuesta individual. Me preguntaba si esa reducida variación intraexperimento se mantiene a lo largo del tiempo entre distintos experimentos.

C. Goicoechea: El modelo por administración de antitumorales implica poca manipulación

y sólo depende de la administración del fármaco, que no es complicada, por lo que es un modelo bastante reproducible. El modelo de ligadura del nervio ciático, una vez has desarrollado la técnica, es absolutamente reproducible y no existen variaciones.

J.M. Vela: En el modelo de paclitaxel habéis utilizado WIN, un agonista no selectivo. Has comentado que el efecto antihiperalgésico y antialodínico es revertido por rimonabant, un antagonista CB1. ¿También lo revierten los antagonistas CB2? En cambio, parece que los antagonistas CB2 están más implicados en la inhibición de la reactividad microglial; en tal caso, ¿el rimonabant revierte esos efectos?

C. Goicoechea: Ciertamente, WIN no es un agonista selectivo y utilizamos el antagonista del receptor CB1 porque era un estudio preliminar. Ahora hay más argumentos a favor de la utilización de antagonistas CB2 porque este receptor es minoritario en el sistema nervioso central. El objetivo es buscar un fármaco con efectos analgésicos sin alteraciones conductuales, y por eso existe esta tendencia hacia los CB2. Respecto a tu segunda cuestión, todavía no lo hemos probado.

J.M. Baeyens: Entre el modelo de ligadura laxa del ciático y el de antitumorales, ¿cuál prefieres?

C. Goicoechea: A mí me gusta el modelo de ligadura del ciático básicamente por cuestiones prácticas: cada animal es su propio control porque se mantiene una pata sana y otra lesionada, hay poca variabilidad en un mismo individuo y entre individuos, y es más barato.

J.M. Baeyens: Parece que cada vez se pone más de manifiesto que el pretratamiento es muy importante para evitar la cronificación del dolor. No sé si estás de acuerdo.

C. Goicoechea: Sí, para el dolor agudo está claro que un tratamiento analgésico previo a la cirugía disminuye la necesidad de analgésicos después de ésta, y el riesgo de cronificación del dolor. Aunque también tengo que decirte que no todos los clínicos están convencidos.

Monografías Dr. Antonio Esteve publicadas

1. El hospital de día y su repercusión en terapéutica (1985).
2. Problemas que se plantean en el tratamiento de infecciones graves por S. aureus (1986).
3. Contribución del biólogo a la farmacología en España (1987).
4. Un glosario para farmacólogos (1987).
5. Aspectos biológicos de los síndromes depresivos (1988).
6. Bases del tratamiento de las intoxicaciones agudas (1988).
7. Investigación básica y medicina clínica (1988).
8. Tratamiento de datos en farmacología (1989).
9. Perspectivas terapéuticas en la esclerosis múltiple (1989).
10. Biotecnología de aplicación farmacéutica (1991).
11. Metodología del ensayo clínico (1991).
12. Periodismo científico. Un simposio internacional (1991).
13. El ensayo clínico como tarea cooperativa (1992).
14. Terapéutica y calidad de vida (1993).
15. Investigación sobre cáncer en España: de la biología molecular a la clínica (1994).
16. El tratamiento del dolor: del laboratorio a la clínica (1994).
17. Farmacología de los canales iónicos (1995).
18. Bases de datos en farmacología y terapéutica (1996).
19. Fármacos y conducción de vehículos (1996).
20. Traducción y lenguaje en medicina (1997).
21. Medicina y medios de comunicación. Traducción al español de una serie publicada en la revista The Lancet (1997).
22. Problemas y controversias en torno al ensayo clínico (1998).
23. Glosario de investigación clínica y epidemiológica (1998).
24. Transducción de señales como diana farmacológica (1999).
25. Investigación médico-farmacéutica en atención primaria. Una visión a través de las publicaciones de la REAP (1999).
26. Modelos experimentales de patología infecciosa (2000).
27. Diccionario de farmacología y temas afines (2000).
28. Educación sanitaria: información al paciente sobre los medicamentos (2000).
29. Aspectos conceptuales del ensayo clínico. Una revisión a través de artículos publicados en Medicina Clínica (1990-1999) (2000).
30. Ensayos clínicos en intervenciones no farmacológicas (2001).
31. Aspectos básicos y clínicos sobre la neurobiología de la adicción (2003).
32. La investigación en un entorno asistencial. Algunas reflexiones y ejemplos (2004).
33. La proyección social del medicamento (2007).

Para solicitar alguno de los números publicados, diríjanse por escrito a la Fundación Dr. Antonio Esteve o a través de la página web: www.esteve.org.

FUNDACIÓN DR. ANTONIO ESTEVE