

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTOS DE GABA, PICROTOXINA E INDOMETACINA SOBRE LA
ACTIVIDAD METABÓLICA DE LINFOCITOS ESTIMULADOS EN
RATONES Balb-C.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMÍCA FARMACÉUTICO - BIÓLOGA

P R E S E N T A

VERÓNICA ROMERO LÓPEZ

MÉXICO D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Saturnino de León Chapa
Vocal	Prof. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
Secretario	Prof. Ma. Guadalupe Reyes García
1er. Suplente	Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís
2do. Suplente	Prof. Myrna Deciga Campos

Laboratorio 202 Edificio B Departamento de Biología
Facultad de Química. UNAM.

Asesor del tema: M en C Ma. Guadalupe Reyes García _____

Supervisor Técnico: Dr. Fernando García Tamayo _____

Sustentante: Verónica Romero López _____

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS...

Que difícil es escribir esto... pensar en quien vas a incluir en tus dedicatorias y a quien le vas a agradecer es difícil así que, de antemano, si alguien no esta incluido y pensó que se merece estar dentro de este escrito... lo siento!!!

Primero que nada, esto es para mi mamá, que con toda la fuerza y entereza de una mujer me ha sacado adelante, algo que yo agradezco. Mamá gracias por todo, por aguantarme y por quererme, no soy muy expresiva pero... sabes que te quiero y te amo con todo lo que tengo y lo que soy.

Para mis asesores y amigos, Dr. Fernando García y Lupita Reyes, gracias por enseñarme el área de la investigación, por ayudarme y asesorarme, por contestar todas mis preguntas... Gracias por todo.

Para mi jurado, Prof. Saturnino, gracias a usted me encanta la inmunología!! Siento que haya tenido que lidiar con mi "gran" tesis. Prof. Atonatiu, gracias por sus comentarios y sus tips.

Para mis compañeros y amigos de la carrera: Ana, Ara, Su, Liz, Eve, Ovix, muchas gracias por estar a mi lado durante toda la etapa estudiantil, por pasarme la tarea, por hacer equipo conmigo, por cargar mis cosas, sacarme libros, invitarme a comer, escucharme, soportarme, los quiero un montón!!! Nos seguiremos viendo eh!

Para mis otros amigos: Ivan, te dije que estarías aquí... te quiero y extraño, mis WTH girls!!! You know... Ivonne, Tere, Jako, Nan, Rox, Diana, por compartir mis sueños con ustedes, Nohemí, Zyanya, Cis, Claudia A todos ustedes, gracias por estar siempre para mí... los quiero!!!

7272 567 4662737 783 553626 64 8432 33 2534742 3 4587466 7272 567
64667 783 6342236 76627 337743782 9 767 567 783 43 266624 36 43683
62728455672 53846 27426 25 46943 6425 2539 32813 2723 7826 229533 567
266 6722427 767 3947847 36 64 8432

Para mi querida universidad, por cobijarme por más de 9 años, por enseñarme tantas cosas, por ponerme delante de excelentes profesores y guiarme por el camino profesional. Por ponerme barreras y enseñarme a derribarlas.

¡¡ORGULLOSAMENTE PUMA!!

Vero Romero L.

* ~Veronika Black~ *

*Loco es quien vive en su mundo. Como los esquizofrénicos, los psicópatas, los maniacos.
O sea personas que son diferentes a los demás,*

Quiero continuar loca, viviendo mi vida como la sueño y no como los demás lo desean...

Paulo Coelho

Veronika Decide Morir

El trabajo de investigación experimental de esta tesis, se desarrolló en el Laboratorio 202 Edificio B, del departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM como parte de un proyecto No. IN221303-2 que recibió apoyo económico de la DGAPA.

Índice

I. Antecedentes

1.1 Interacciones Neuroinmunológicas

1.1.1	Los nexos entre el cerebro y el sistema inmune	2
1.1.2	Los primeros experimentos	4
1.1.3	Las moléculas mediadoras	9
1.1.4	Alteraciones cerebrales y el sistema inmunológico	13
1.1.5	La naturaleza de las interacciones	14
1.1.6	La modulación de las interacciones neuroinmunológicas	17
1.1.7	Los mensajeros químicos del sistema inmunológico	18
1.1.8	Los agentes neuroendocrinos que afectan la actividad celular inmune	20
1.1.9	Inmunoregulación simpática	21
1.1.10	Inmunoregulación a nivel hipotálamico	22

1.2 Neurotransmisores

1.2.1	Generalidades sobre la comunicación interneuronal	24
1.2.2	Características de la sinapsis	25
1.2.3	Características de los canales iónicos	26
1.2.4	Aspectos generales de la neurofarmacología	27
1.2.5	Conceptos de neurotransmisión química	28
1.2.6	Lugares de acción de mediadores químicos	36

1.3 Características del ácido- γ -aminobutírico (GABA)

1.3.1	El ácido γ -aminobutírico (GABA)	37
1.3.2	Síntesis y metabolismo de GABA	38
1.3.3	Liberación e inactivación de GABA	45
1.3.4	La distribución de GABA en el SNC	48
1.3.5	GABA y su función	53
1.3.6	Farmacología del GABA	57

1.4	Receptores de GABA	
1.4.1	¿Qué es el receptor GABA?	59
1.4.2	Receptor GABA _A	60
1.4.3	Receptor GABA _B	67
1.4.4	Receptor GABA _C	70
1.4.5	Células blanco para GABA fuera del SNC	72
1.4.6	Receptores de GABA median la inhibición de la respuesta de las células T	75
1.5	Agonistas y antagonistas de GABA	
1.5.1	Farmacología de las neuronas GABAérgicas	77
1.5.2	Agonistas de GABA	77
1.5.3	Antagonistas de GABA	80
1.5.4	Modificación del receptor GABA _A neuronal por fármacos	82
1.5.5	Farmacología del receptor GABA _B	83
1.5.6	Farmacología del receptor GABA _C	84
1.5.7	Agonistas del receptor GABA _C	85
1.5.8	Antagonistas del receptor GABA _C	86
1.6	Aplicaciones de GABA	88
1.7	Sal de Tetrazolio: MTT	
1.7.1	Aplicaciones	92
1.7.2	Ventajas	93
1.7.3	Desventajas	94
1.8	La respuesta inflamatoria	
1.8.1	La inflamación	97
1.8.2	Mediadores humorales	103
1.8.3	Mediadores celulares	115
1.8.4	Inflamación aguda	119
1.8.5	Inflamación crónica	121

1.9 Antiinflamatorios no esteroideos (NSAID). Indometacina	
1.9.1 Antiinflamatorios no esteroideos	124
1.9.2 Mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos	125
1.9.3 Efectos secundarios de los NSAID	129
1.9.4 Interacciones farmacológicas de los NSAID	135
1.9.5 Indometacina	136
1.10 Indometacina, GABA y la inflamación	142
II. Objetivos e Hipótesis	
2.1 Objetivos e Hipótesis	147
III. Diseño del trabajo	
3.1 Diagrama de flujo	149
IV. Métodos	
4.1 Métodos	
4.1.1 Animales	151
4.1.2 Extracción del bazo	151
4.1.3 Separación de linfocitos	151
4.1.4 Medida de la viabilidad celular	151
4.1.5 Ajuste celular	152
4.1.6 Cultivo de linfocitos	153
a. En presencia de PTX	153
b. En presencia de GABA	153
c. En presencia de Indo	153
d. En presencia de GABA e Indo	154
e. En presencia de PTX e Indo	154
4.1.7 Reducción del MTT	155
4.1.8 Viabilidad final	155
V. Resultados	
5.1 Viabilidad celular	
5.1.1 Cultivos de linfocitos con Con-A	159

5.1.2	Cultivos de linfocitos con PTX	159
5.1.3	Cultivos de linfocitos con GABA	161
5.1.4	Cultivos de linfocitos con Indo	163
5.2	Reducción de MTT <i>in vitro</i>	
5.2.1	Tratamiento de los linfocitos con Con-A	165
5.2.2	Tratamiento de los linfocitos con PTX	167
5.2.3	Tratamiento de los linfocitos con GABA	168
5.2.4	Tratamiento de los linfocitos con Indo	169
5.2.5	Tratamiento de los linfocitos con PTX más Indo	171
5.2.6	Tratamiento de los linfocitos con GABA más Indo	172
VI.	Análisis estadístico	
6.1	Prueba de Tukey	
a)	Concanavalina-A	175
b)	Picrotoxina	175
c)	GABA	176
d)	Indometacina	176
e)	Picrotoxina + Indometacina	176
f)	GABA + Indometacina	176
VII.	Discusión de resultados	178
VIII.	Resumen	183
IX.	Conclusiones	186
X.	Bibliografía	188
XI.	Apéndices	
	Apéndice 1. Vías metabólicas alternativas para GABA	195
	Apéndice 2. Equipos, soluciones y reactivos	196
	Apéndice 3. Abreviaturas	200

1.1 Interacciones Neuroinmunológicas

1.1.1 LOS NEXOS ENTRE EL CEREBRO Y EL SISTEMA INMUNE.

No hace mucho tiempo, un profesor de medicina interna en una escuela de medicina de renombre estaba charlando con un colega también muy destacado, que era profesor de psiquiatría. El profesor de medicina preguntó al psiquiatra en qué estaba trabajando. El psiquiatra le dijo que estaba estudiando la relación entre el sistema inmunológico y el cerebro. Al oír eso, el primero lo miró con asombro y murmuró: *“No puedo pensar en dos sistemas con menor probabilidad de relación”*. En realidad, en aquellos años era casi una blasfemia en medicina sugerir que el sistema inmunológico podía estar controlado por algo que no fuera él mismo⁴.

Hasta hace aproximadamente tres décadas, existía una fuerte evidencia de que el sistema inmunológico se arreglaba muy bien sin la ayuda ni interferencias de los restantes sistemas y aparatos del organismo. Se creía que el mensaje era claro: el sistema inmunológico no trabaja apoyado por el cerebro por la sencilla razón de que no necesita de éste para desempeñar su función. El sistema inmune funciona con piloto automático.

Sin embargo, solo hizo falta que transcurrieran unos pocos años más para que el Doctor Terry Strom, un respetadísimo inmunólogo de la Escuela de Medicina de Harvard, se atreviera a declarar lo siguiente en una reunión con sus colegas. *“A pesar de la capacidad del sistema inmunológico para autorregularse, lo cual está espléndidamente bien documentado, no creo que existan dudas de que el cerebro y las hormonas pueden influenciar de alguna manera el resultado de una reacción inmunitaria”*⁴.

A pesar de la afirmación anterior y de muchas otras opiniones similares, todavía hoy en día, en algunos grupos de inmunólogos, neurólogos y psiquiatras, prevalece una actitud de escepticismo. Cuando un periodista de una revista científica líder entrevistó a algunos inmunólogos sobre sus reacciones ante los descubrimientos hechos por los psiconeuroinmunólogos, muchos ignoraban que existiera esta rama de la ciencia⁴. Por

otra parte, algunos neurólogos y no pocos psiquiatras se resisten a aceptar que los linfocitos o las citocinas puedan estar involucrados en los sueños, las fantasías y hasta en las lesiones neurológicas de sus pacientes.

Actualmente es muy fuerte la evidencia de que existen estrechas interacciones entre los sistemas nervioso e inmune. Numerosas observaciones y comprobaciones experimentales han surgido de diversas fuentes. Se ha investigado desde la superficie de los glóbulos blancos individuales, desde las expediciones realizadas cuidadosamente por los difíciles senderos del sistema nervioso y desde la terriblemente complicada farmacología del cuerpo -sus narcóticos, estimulantes y sistemas de señales-, a la misteriosa sinergia de sus elementos.

Los investigadores disponen ahora de suficiente información sobre la forma en que los pensamientos y los cambios de humor ponen en movimiento un ballet de hormonas, neurotransmisores y actividades de la célula nerviosa que tienen un efecto sutil pero notable sobre la salud. Hoy día el valor de la evidencia es tal que, según sugiere el investigador europeo Johan Ahqvist, “*negar la posibilidad de lazos estrechos entre el estado mental y las reacciones inmunológicas debería verse como un suicidio científico*”⁴.

Una de las demostraciones más espectaculares de esa relación íntima entre el cerebro y el sistema inmunitario es la serie de experimentos realizados en la década de los años 70 por Robert Ader, del Departamento de Psiquiatría de la Escuela de Medicina de la Universidad de Rochester⁴. Ader continuó los estudios que había iniciado Pavlov en 1928 sobre el condicionamiento de las respuestas fisiológicas y que habían continuado varios otros investigadores tanto en Rusia como en USA. Su descubrimiento fue un punto de inflexión en la investigación, ya que él y Cohen (un inmunólogo que era su colaborador) orientaron su trabajo al estudio de la inmunosupresión y la posibilidad de que esta respuesta se pudiera condicionar a la ingestión de sacarina. Ellos confirmaron las conclusiones iniciales de los científicos soviéticos⁴ de que la respuesta del sistema inmunológico podía condicionarse a la percepción del sabor de un edulcorante.

Los resultados de Ader enviaron tremendas ondas de shock a la comunidad científica. Numerosos investigadores -psiquiatras, inmunólogos y otros- repitieron

ansiosamente el experimento de Ader pensando en demostrar que era absurdo. Después de todo él era solo un psiquiatra (aunque con la ayuda de un inmunólogo) metiéndose en un campo que no resultaba exactamente su especialidad.

Al final, la última palabra la dieron sus investigaciones, que habían sido realizadas con sumo cuidado y que confirmaban los descubrimientos de varios grupos de investigadores en la Unión Soviética. Con el paso del tiempo, otros laboratorios obtuvieron los mismos resultados y otros investigadores rusos fueron atraídos inexorablemente a las mismas conclusiones de que ya no resultaba aplicable el modelo de un sistema inmunológico autónomo y automático. Varios años más tarde, Ader tuvo el placer de releer la conclusión de su primer trabajo, tan controvertido, de 1975: *“Estos resultados sugieren que puede existir una relación íntima y virtualmente inexplorada entre el sistema nervioso central y los procesos inmunológicos”*⁴.

Y así fue como sucedió que hubo una vez, hace aproximadamente 30 años, un grupo de investigadores que se aventuró a buscar lo que muchos negaban que existía: el nexo entre el cerebro y el sistema inmunitario.

1.1.2 LOS PRIMEROS EXPERIMENTOS

Para poder explicar los nexos anteriores, gran parte de la búsqueda se centró en el lugar más obvio: el cerebro. La noción de que el cerebro podría afectar al sistema inmunológico había estado rondando en la mente de varios inmunólogos desde hacía varios años. Steven Locke, en su libro, “El médico interior”⁴ menciona que en un experimento realizado en 1924, un investigador tomó uno de sus conejos de laboratorio, le ligó todos los vasos sanguíneos que llegaban a una de las orejas, inyectó un antígeno para estimular el sistema en esa oreja y la cortó tres segundos después.

Según las teorías inmunológicas convencionales, no debió haberse producido ninguna respuesta por parte del sistema inmune. Al ligar los vasos sanguíneos el investigador aisló el antígeno del resto del cuerpo, de tal modo que no había forma de que, en tan poco tiempo, el sistema inmunológico pudiera haber reconocido el antígeno inyectado en una oreja que había sido cortada casi inmediatamente después.

Sin embargo, cuando este investigador analizó una muestra de sangre del conejo encontró anticuerpos específicos contra el antígeno que había inyectado en la oreja del animal. ¿Cómo era posible que si los vasos sanguíneos estaban ligados, el antígeno hubiera sido transportado por la sangre lejos del lugar de su inyección, lo suficiente como para alertar al sistema inmunológico? El investigador llegó a la única conclusión lógica que se podía esperar, de acuerdo al conocimiento inmunológico de esos años: el sistema inmunológico podía funcionar sin la estimulación química del antígeno que circulaba con la sangre. ¿Cuál era el mecanismo por el cual el experimento daba resultados positivos? En ese momento nadie tenía una respuesta y ésta pareció estar escondida en algún lugar del sistema nervioso. Fue necesario que transcurrieran varios años antes de que comenzaran a obtenerse explicaciones.

Con todos estos antecedentes, gran parte de las investigaciones siguientes sobre las relaciones entre los sistemas nervioso e inmune se centraron en el cerebro. El hipotálamo recibió una atención especial porque químicamente ejerce un gran control sobre todo el cuerpo, mediante hormonas y neurotransmisores y el sistema nervioso autónomo. Esta pequeña región coordina una gran parte de la actividad del organismo, ya que no solo transmite sino que también recibe señales del sistema nervioso a través de los nervios y señales hormonales a través de la sangre. Debido a su amplia esfera de influencia, el hipotálamo puede considerarse un centro homeostático. Recibe numerosas señales provenientes de las amígdalas, de otras regiones del cerebro y de la sangre y, responde a su vez, enviando otras señales distintas a diferentes partes. Así por ejemplo, el hipotálamo controla a través de la hipófisis las glándulas del sistema endocrino, regula el apetito y controla el nivel de azúcar en sangre, así como el contenido líquido de la misma. Además actúa como el termostato del cuerpo, regulando y controlando la temperatura.

El hipotálamo es como una fábrica de sustancias químicas. Elabora y segrega hormonas que van a participar en la estimulación del eje hipotálamico-hipofisario-adrenal (eje HHA) y en la consiguiente respuesta de estrés, la cual desata la producción de una avalancha de otras sustancias químicas corporales —como los glucocorticoides— que influyen sobre el recambio de la energía corporal almacenada y las catecolaminas (epinefrina y dopamina) que se liberan en las terminaciones del sistema nervioso autónomo e influyen en la vida vegetativa de cada individuo.

Además de todos los efectos anteriores, el hipotálamo tiene varios otros más, que afectan la respuesta del sistema inmunológico y que son igualmente importantes. Un grupo de investigadores de Europa Central y la Unión Soviética fue el primero en sospechar el potencial inmunitario de esos pequeños conjuntos de neuronas localizados en la base del tejido cerebral. En 1958, dos investigadores húngaros, Geza Filip y Andor Szentivanyi ⁴, descubrieron que, al quitar la parte media del hipotálamo podían proteger a los conejillos de indias del shock anafiláctico. Estos investigadores encontraron que los animales cuyos cerebros habían sido alterados en esta forma selectiva mostraban escasa reacción a un alérgeno. Por el contrario, diez de trece animales cuyos cerebros no habían sido alterados murieron cuando se les administró la misma dosis alérgica que a los operados.

A principios de la década del 60 comienzan a divulgarse los trabajos de una investigadora rusa, Elena Korneva, del Instituto de Medicina Experimental de Leningrado, por los cuales ella y sus colaboradores encontraban que el hipotálamo tenía además otra función notable, diferente a todas las conocidas hasta ese momento. Ella obtuvo cambios importantes en la respuesta del sistema inmunológico después de lesionar en forma selectiva varias partes diferentes del hipotálamo⁴. Por ejemplo, cuando la porción posterior o dorsal se seccionaba, se suprimían ambos tipos de reacción inmunitaria: la celular y la humoral.

El psiquiatra norteamericano George Solomon descubrió el trabajo de Korneva y repitió algunos de sus experimentos con resultados similares⁴. Él encontró que cuando lesionaba el hipotálamo, la actividad del timo se inhibía notablemente. Solomon fue uno de los primeros investigadores norteamericanos que sugirieron que el sistema nervioso central -el cerebro y la médula espinal- desempeñaba un papel importante como modulador del sistema inmunitario.

El psiquiatra Marvin Stein y sus colegas de la Escuela de Medicina Mount Sinai, en la Ciudad de Nueva York, también habían estado estudiando el efecto del cerebro (específicamente del hipotálamo) sobre el sistema inmunológico⁴. En uno de sus experimentos, Stein eliminó la porción anterior del hipotálamo de conejillos de indias mediante una pequeña descarga de corriente eléctrica. Luego inoculó a los animales con las proteínas purificadas de la clara de huevo y los sensibilizó para que reaccionaran

violentamente a la segunda dosis.

Cuando los cobayos recibían la segunda dosis, morían ocho de cada diez, cuyos cerebros no habían sido tocados. De aquellos cuyos cerebros habían sido destruidos solo parcialmente moría menos de un 20 %. De este modo, Stein estableció un nexo entre una zona determinada del cerebro (la región anterior del hipotálamo) y la respuesta inmunitaria humoral responsable de las reacciones anafilácticas. El daño sufrido por el hipotálamo repercute en el sistema inmunológico. El trabajo de Stein sugiere que la pérdida de ese control por parte del hipotálamo se manifiesta en la inhibición parcial o total del sistema.

El investigador francés Gerard Renoux de la Escuela de Medicina de Tours, especialista en el cerebro, había escuchado historias de pacientes humanos con graves daños en la neocorteza (la capa externa gris cerebral) y cuyos sistemas inmunológicos disminuyeron la actividad. Los resultados de sus trabajos iniciales⁴ sugieren que no solo el cerebro tiene influencia en el sistema inmunológico, sino que partes diferentes del cerebro tienen distintas clases de influencia.

En experimentos con cerebros de ratones cuando Renoux extrajo un tercio del lado izquierdo del cerebro del animal, el organismo reaccionaba más débilmente a los antígenos extraños. Cuando él extrajo parte del hemisferio izquierdo de los ratones, pudo observar una disminución del número de linfocitos T en el bazo, centro recolector importante de células del sistema inmunitario. (Una extirpación similar del hemisferio derecho no tuvo ese efecto). Los experimentos sugirieron a Renoux que el lado izquierdo del cerebro tiene la influencia más directa sobre el sistema inmunológico.

Como los cambios de personalidad son profundos -en algunos pacientes estaban acompañados por cambios de ondas cerebrales características-, los cambios en la respuesta inmunológica explican que el cerebro es un factor decisivo. Una teoría sumamente ingeniosa⁴ fue desarrollada por el neurólogo Norman Geschwind, (ya fallecido), de la Escuela de Medicina de Harvard y del Beth Israel Hospital, y un ex alumno de él, Peter Behan (ahora en la Universidad de Glasgow). La hipótesis de Geschwind sostiene que no es una simple coincidencia el que las personas que padecen la alteración de la lectura conocida como dislexia tengan una tasa más alta de

enfermedades autoinmunitarias que la del promedio de la población. La clave del misterio, dijo Geschwind, está en la manera en que se desarrolla el cerebro, en particular en los varones.

Esas claves incidentales se unieron en la mente de Geschwind. En sus propias investigaciones, él había observado que los disléxicos suelen ser zurdos. Geschwind, un experto en desarrollo cerebral, tuvo en cuenta la información y se preguntó que tenían en común la dislexia, el sexo masculino, el uso preferente de la mano izquierda y las enfermedades autoinmunitarias: *“La pregunta normal es porque esta asociación”,* dijo él. *“Podría decirse que este efecto (enfermedad autoinmunitaria) es completamente psicológico por causa del estrés producido por las alteraciones del aprendizaje. Pienso que eso es insostenible”*⁴.

Geschwind prefirió suponer que la hormona masculina, testosterona, y su acción sobre el cuerpo y el timo eran las piezas que faltaban en el rompecabezas. Para la mayoría de las personas el lado izquierdo del cerebro es el dominante. Controla al lado derecho del cuerpo y es el responsable de las tareas de comunicación, tales como hablar, leer y escribir. Como los disléxicos son zurdos en su mayoría y de pocas aptitudes verbales, Geschwind pensó que la mitad derecha de sus cerebros era la dominante. Y como muchos disléxicos son varones, Geschwind dedujo que la testosterona era la clave del carácter dominante del cerebro derecho. Desde la infancia la testosterona está controlando el crecimiento del cerebro. La hormona podría haber influido también en el desarrollo del timo. Y Geschwind señaló: *“Sabemos que la testosterona puede inhibir la actividad de la glándula timo. Como el timo tiene importancia en la maduración del sistema inmunológico eso podría explicar la asociación entre el uso preferente de la mano izquierda y las enfermedades autoinmunitarias.”*

Todas estas observaciones e hipótesis se completaron cuando la neuroanatomista Karen Bulloch descubrió⁴ que el timo de la rata estaba envuelto con fibras del nervio vago, uno de los doce nervios conectados con el cerebro en forma directa. La disposición de las fibras nerviosas en el timo es sorprendentemente invariable en los animales, desde los roedores hasta los humanos.

La teoría de Bulloch es que no solo el cerebro puede afectar el timo sino que éste

necesita de una cierta cantidad de tejido nervioso para funcionar de manera normal y producir los indispensables linfocitos T maduros. En apoyo de esto, Bulloch encontró que una cepa particular de ratones que tiene el sistema inmunológico débil también posee sus timos poco desarrollados y con escasas fibras nerviosas. Bulloch piensa que hay un impulso espontáneo del cerebro hacia los nervios que lo conectan con el timo. Para demostrar esta hipótesis, en un experimento encerró tejido del timo en una cápsula porosa y lo implantó en un ratón que había nacido sin la glándula timo. Con el transcurso del tiempo las fibras nerviosas del cuerpo del animal empezaron a infiltrarse en la cápsula buscando conectarse con la glándula perdida.

1.1.3 LAS MOLÉCULAS MEDIADORAS

Continuando estas investigaciones neuroinmunológicas, en un trabajo realizado en la Universidad de Indiana, David Felten, John William y otros, usaron colorantes fluorescentes especiales para seguir los recorridos de los nervios.⁴ Los canales los llevaban no sólo a zonas del timo donde se producen las hormonas sino también al bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea. Felten encontró además una red nerviosa que termina cerca de los vasos sanguíneos y otras zonas por las que pasan los linfocitos y sugiere que los nervios podrían tener influencia sobre la afluencia de glóbulos blancos. *“La inervación (el desarrollo de los nervios) sigue a los vasos sanguíneos dentro de los órganos y se ramifica hacia fuera en el campo de los linfocitos”* dice Felten.

Pero el equipo de Felten hizo otro descubrimiento más importante⁴. Demostró que muchas de las sinapsis del sistema nervioso, zonas próximas a las terminaciones nerviosas desde donde se envían los impulsos o las señales químicas, estaban situadas cerca del timo y de las concentraciones de células basófilas del bazo (células inmunitarias cargadas de gránulos que contienen sustancias químicas). Encontró grupos de fibras nerviosas cerca de esas células, lo que sugiere una directa conexión neuronal.

Esos descubrimientos esclarecieron lo que el grupo decidió llamar *mecanismo neuromodulador*, que podía actuar directamente sobre los linfocitos que maduraban dentro del timo y en el bazo o los afectaban en forma indirecta al indicar a las células basófilas que descargaran su potente contenido de aminas vasoactivas. En pocas

palabras, al parecer todos los sectores fundamentales del sistema inmunológico están conectados con el cerebro.

Todos los experimentos mencionados revelan la importancia que tiene la presencia del sistema nervioso para el buen funcionamiento del sistema inmunitario. Pero todavía no se conocían los mecanismos de esos efectos. Un equipo de investigadores japoneses⁴ realizó un experimento sencillo para investigar el sistema nervioso simpático -el sistema que controla la vida vegetativa o refleja en el organismo- en un grupo de animales de laboratorio, a los cuales se les administraron sustancias químicas que destruyen las terminaciones nerviosas. Poco después de esa destrucción, el sistema inmunológico de los animales funciona sin ningún control, atacando al cuerpo que lo contiene. Ese trabajo sugirió que el sistema nervioso simpático (el sistema que aumenta su respuesta en las situaciones de estrés) tiene una acción frenadora de las actividades inmunológicas. Con estos resultados, la noción de que el cerebro tiene una conexión directa con el sistema protector comenzó a dar explicaciones para las observaciones que habían encontrado depresiones del sistema inmune en situaciones psicológicas especiales como el estrés crónico.

El poder del cerebro y del sistema nervioso autónomo fue descrito con claridad a principios de siglo pasado por el fisiólogo de Harvard Walter B. Cannon. Este fisiólogo norteamericano se sentía fascinado por el tema de la reacción al estrés y esquematizó un proceso al que denominó *reacción de lucha o huida*⁴. Cuando el cerebro percibe que una situación -un juicio o la obligación de hablar en público- produce estrés, esa percepción es una señal de los niveles más altos del cerebro del tallo cerebral, un corto haz de nervios que conectan el cerebro con la columna vertebral. El tallo cerebral, a su vez, excita al sistema nervioso autónomo visceral, la red de nervios que regula las actividades del cuerpo (digestión, latidos del corazón, funcionamiento de las glándulas, contracción y dilatación de los vasos sanguíneos), funciones que en un tiempo se consideraban independientes del control consciente.

El sistema nervioso autónomo tiene dos subdivisiones: el simpático y el parasimpático. El destino del sistema simpático es responder a cualquier señal de alarma que reciba del tallo cerebral y ayudar a la movilización del organismo para la acción. Estimula la circulación de la sangre y el latido cardiaco y aumenta las

secreciones glandulares. El sistema parasimpático tiene un papel *yin* respecto del *yang* del simpático, ya que disminuye las funciones corporales y ayuda a digerir los alimentos y, en general, a tomar las cosas con calma.

Durante la reacción de estrés parte del simpático avisa al par de glándulas adrenales. Al recibir la señal la médula adrenal comienza a segregar las poderosas hormonas epinefrina y dopamina. Los dos son mensajeros químicos que preparan al organismo para reaccionar.

La mayor parte del conocimiento del efecto del cerebro en el cuerpo proviene de la investigación del estrés. También se sabe que, durante el estrés, la glándula pituitaria aumenta su descarga de las endorfinas, poderosas químicos cerebrales⁴. Además de ser analgésicos naturales, se sospecha que las endorfinas realizan otro trabajo metabólico: nos ayudan a aprender, recordar e intervienen en la regulación de la temperatura corporal.

La concentración más alta de las endorfinas está en la pituitaria; ante cualquier clase de estrés, desde la depresión y la infección bacteriana hasta el ejercicio, la pituitaria descarga endorfinas al torrente sanguíneo⁴.

Fascinado por la capacidad del cerebro de producir sus propias sustancias contra el dolor, el fisiólogo John Liebeskind, de la Universidad de California, en Los Ángeles (UCLA), decidió determinar el valor de esa capacidad natural para disminuir el dolor.

Liebeskind esperaba aprender más sobre el sistema si encontraba la manera de obligar al cuerpo a producir analgésicos a su voluntad. Liebeskind⁴ descubrió durante sus experimentos con animales que sólo ciertas clases de estrés obligaban a la descarga de los analgésicos naturales. Administró a sus animales cortas descargas eléctricas débiles y aparecieron las endorfinas. Pero, si les aplicaba una dosis de electricidad continuamente durante tres minutos, aparecía un analgésico natural que no era una endorfina. En el vocabulario de los fármacos cerebrales no era un narcótico u opiáceo.

Cuando produjo en las ratas los shocks inductores de narcóticos, ciertas células

inmunitarias -las asesinas naturales que luchaban contra el cáncer- se volvieron menos activas. (Esa disminución de la actividad no se produjo cuando el shock era prolongado.)

En experimentos similares uno de los investigadores que colaboraban con Liebeskind, el psicólogo Yehuda Shavit, halló también que la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (células NK) contra los tumores disminuye en las ratas con estrés inductor de endorfinas⁴.

Para probar la hipótesis de la endorfina, Shavit inyectó a las ratas una droga que bloquea los efectos de la morfina y sustancias relacionadas. Su razonamiento era sencillo: si las endorfinas disminuían la inmunidad del organismo, anulando la capacidad del cuerpo de absorberlas también debería anularse la acción inhibitoria de la inmunidad. Y eso fue lo que ocurrió cuando Shavit inyectó el bloqueador de la morfina. Los sistemas inmunológicos de los animales, específicamente las células NK, se volvieron más reactivas.

En otra prueba, Shavit administró a sus animales un narcótico sintético: morfina. El resultado fue el mismo: el efecto endorfina disminuyó la potencia de la acción de las células NK: cuanto más alta era la dosis de morfina, más baja era la actividad de las células asesinas naturales.

Shavit y Liebeskind decidieron que las endorfinas tienen un efecto inhibitorio por lo menos en una parte del sistema inmunológico. Este efecto explicaría porque, en experimentos anteriores, encontraron que el estrés opioide empeoraba una forma de cáncer de ratas: el cáncer de mama. Como las endorfinas son sintetizadas por el cerebro, este *“ejerce también una especie de control sobre el comienzo y el desarrollo de la enfermedad”*, dice Liebeskind.

Todavía es un misterio la forma en que los narcóticos hacen lo que hacen. Las drogas cerebrales pueden actuar directamente sobre las células inmunitarias, pueden tener una influencia indirecta al iniciar la descarga de las hormonas inmunosupresoras o pueden tener alguna acción sobre el sistema nervioso.

1.1.4 ALTERACIONES CEREBRALES Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO.

La idea de que el sistema nervioso puede ejercer una influencia sobre el sistema inmunológico solo tiene sentido si comprendemos las funciones de los dos sistemas.

Hace varios años, el Doctor Albert Goldstein encontró claras muestras de un desorden inmunológico en la sangre de los esquizofrénicos⁴. Él detectó que esos enfermos mentales tienen en la sangre sustancias similares a las que se encuentran en los pacientes con enfermedades autoinmunitarias como la artritis reumatoide.

También observó que cuando administraba el tranquilizante clorpromazina a los pacientes de esquizofrenia, no sólo desaparecían algunos de los síntomas de la enfermedad sino también algunas anormalidades microscópicas del sistema inmunitario. (Además de ser un tranquilizante, la clorpromazina es también un inmunoinhibidor.) Esta correlación indica que el cerebro es sensible a algunos de los mismos compuestos bioquímicos que se producen en el curso del desequilibrio del sistema inmunológico. En cierto sentido, el desorden mental y la enfermedad autoinmune comparten el mismo vocabulario bioquímico⁴.

Si el cerebro y el sistema inmunológico comparten las mismas señales bioquímicas, ¿pueden comunicarse? Para que el cerebro dé instrucciones inteligentes al sistema inmunológico, primero debe saber que está sucediendo. Un investigador argentino residente en Suiza, Hugo Besedovsky, demostró que existía un modo de evidenciar las señales del sistema inmunológico al cerebro. Primero midió la actividad eléctrica del hipotálamo del cerebro de una rata. Luego Besedovsky inyectó al animal antígeno virulento. Mientras las células inmunitarias de la rata se movilizaban para luchar contra los invasores, Besedovsky observó cuidadosamente la conducta del cerebro respecto a los cambios de la actividad eléctrica⁴. Encontró la evidencia. Durante la batalla que libraba el sistema inmunológico ocurría un aumento significativo en la velocidad de trabajo de las neuronas. La agitada actividad inmunológica tenía un paralelo de actividad eléctrica cerebral, la cual aumentaba más de 100 veces. Hasta que Besedovsky conectó sus electrodos a los cerebros de sus ratas, solo había evidencia de que el cerebro podía enviar señales al sistema inmunológico, pero no la había que éste las recibiera. Por primera vez, Besedovsky la proporcionó. Él escribió:

“Esos hallazgos constituyen la primera evidencia de una corriente de información entre el sistema inmunológico y el hipotálamo, que sugiere que el cerebro participa en la respuesta inmunológica”⁴.

Besedovsky y otros investigadores expandieron su descubrimiento cuando buscaron los cambios producidos dentro del cerebro al recibir la señal del sistema inmunológico. Se inyectaba el material inmunorreactivo en las ratas; cuanto más fuerte era la reacción inmunitaria, más vertical era la caída de un neurotransmisor: la norepinefrina. Esta investigación demostró que el sistema inmunológico no solo podía hacer que su mensaje llegara al cerebro sino que obligaba a que se produjeran algunos cambios. Se advirtió entonces que el nexo entre el sistema inmunológico y el cerebro era más íntimo de lo que se había supuesto⁴.

El bioquímico Nicholas Hall, encontró otra posible conexión química entre el cerebro y el sistema inmunológico, pero a través del timo. Hasta ese momento se conocía que cuando el timo segrega sus hormonas, hace dos cosas: 1) acelera la maduración de las células inmunitarias a células T (cuanto más timosina segrega, más células T envía) y 2) envía una señal al cerebro.

Hall y sus colegas propusieron una teoría diferente⁴. Se sabe que el organismo tiene un agudo sentido de la fuerza y el número de los enemigos que está destruyendo. Como parte de un sistema exquisitamente eficiente de autoprotección, los niveles de timosina se elevan y llegan al máximo en un tiempo aproximadamente igual al que lo hacen los anticuerpos. Una vez que ha entrado en acción el número adecuado de células, debe existir un método para que el timo interrumpa el ataque. La teoría de Hall y Goldstein es que lo hace enviando una señal al cerebro.

1.1.5 LA NATURALEZA DE LAS INTERACCIONES

En la actualidad hay dos vías de evidencia referente a la conexión del cerebro con el sistema inmunológico. Uno, en gran parte obtenido por deducción, incluye lo siguiente:

- La conclusión de Robert Ader de que las funciones inmunológicas son

susceptibles de influencia cerebral, basada en los experimentos en los que el pudo producir cambios en el sistema inmunitario mediante comportamiento condicionado.

- Los trabajos de los soviéticos, George Solomon, Marvin Stein, Gerard Renoux y otros demostrando que el daño selectivo a partes de la neocorteza cerebral y el hipotálamo puede producir cambios también selectivos en el sistema inmunológico.
- Las teorías de Norman Geschwind, Peter Sifneos y John Nemiah sugiriendo que ciertas diferencias estructurales del cerebro que influyen en la comunicación afectan el curso de las enfermedades inmunológicas.

El segundo cuerpo, que comprende evidencias más directas, incluye lo siguiente:

- La cuidadosa investigación del camino de los nervios que descubrió su infiltración en zonas importantes del sistema inmunológico: la médula ósea, el timo, el bazo, los ganglios linfáticos.
- La evidencia de que sustancias análogas a la morfina, las endorfinas secretadas por el cerebro, tienen efectos inhibidores y activadores de la inmunidad.
- Los hallazgos que demuestran la existencia de líneas activas de comunicación entre el cerebro y el sistema inmunológico: es decir, de moléculas mensajeras y de sus receptores específicos de uno y otro lado.

La complejidad del mecanismo de la conexión cerebro-sistema inmunológico ha sido cada vez más evidente a medida que se tiene más información sobre los dos sistemas. Una cuestión que algunos han propuesto resolver es cuál de los dos sistemas es el dominante. Pero en estas interacciones que implican una homeostasis, no parece probable la existencia de un sistema débil y otro fuerte.

Si bien en forma intuitiva uno esperaría que el cerebro fuera el que controlara la interrelación, en numerosas situaciones puede no ser así. Algunos investigadores sugieren que el sistema inmunológico tiene tal grado de refinamiento que apenas estamos comenzando a conocerlo. Puede funcionar en el organismo como un “sexto sentido”, detectando los elementos del ambiente que escapan a los otros sentidos. Hugo Besedovsky sugiere que el sistema inmunológico es una extensión del cerebro, un

“órgano receptor periférico” que pone al cuerpo en estado de alerta⁴, y el psiquiatra Joel Elkes ha llamado al sistema inmunológico “el sistema nervioso líquido”⁴.

Estas ideas reciben el fuerte apoyo de J. Edwin Blalock, bioquímico de la Universidad de Texas. Las investigaciones microscópicas de Blalock acerca del sistema inmunitario han develado nuevas sorpresas; entre ellas, que los glóbulos blancos pueden elaborar sustancias prácticamente idénticas a ciertos péptidos que produce el sistema nervioso⁴. Entre los péptidos que los leucocitos pueden producir está la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) o corticotrofina, que habitualmente es secretada por las células de la glándula pituitaria y que tiene un papel preponderante en las reacciones de estrés.

Esta capacidad sugiere, según Blalock, que el cerebro no es el único órgano sensible al estrés en forma directa. El sistema inmunológico tiene la misma capacidad de reacción ante situaciones estresantes, ya que aumenta la producción de las mismas sustancias que usa el cerebro para provocar un aumento en la producción de glucocorticoides.

Como una prueba de su teoría, Blalock estudió a un grupo de niños con deficiencias pituitarias que estaban recibiendo algunas vacunas de rutina. Por causa de las deficiencias hipofisarias era poco probable que sus organismos produjeran ACTH cuando sufrían estrés. Sin embargo, cuando se les administraron las vacunas, lo que hubiera producido estrés suficiente en niños normales para que sus organismos elaboraran ACTH, los de los niños deficitarios también lo hicieron, y, según Blalock, la fuente de ACTH fue el sistema inmunitario y no el cerebro conectado a la hipófisis.

Dada la capacidad del sistema inmunológico para reaccionar al mundo exterior, Blalock sugiere: *“Quizá una de sus funciones es servir como órgano sensorial”*⁴. La diferencia es que los fenómenos que percibe no están en el campo de la visión, la audición, el tacto, el gusto ni el olfato. “El sistema inmunológico es un sistema sensorial para el tacto molecular”. El sistema posee una habilidad extrema para detectar moléculas antigénicas no autógenas. Los linfocitos pueden reconocer un millón de antígenos diferentes por su forma molecular. El sistema inmunológico evoluciona en el tiempo poniendo al día su memoria inmunológica mediante un proceso de selección

molecular natural.

La relación descubierta hace poco tiempo entre el sistema nervioso y el inmunológico está llevando de vuelta a la medicina a un punto de vista más holístico del cuerpo humano. Las inesperadas capacidades del sistema inmunológico para producir moléculas similares a las que se producen en el cerebro ofrecen nuevos campos a la investigación para saber qué sistema es el dominante. La respuesta puede estar en la sugerencia del neurocientífico Novera Herbert Spector, del National Institute of Health. A la pregunta respecto de cual es el sistema que controla, él responde: *“La respuesta es obvia, y las investigaciones lo demostrarán: los dos sistemas se controlan mutuamente”*⁴.

1.1.6 LA MODULACIÓN DE LAS INTERACCIONES NEUROINMUNOLÓGICAS.

La respuesta inmune provoca cambios funcionales cerebrales, autónomos y endocrinos. Estos cambios pueden ser mediados por factores solubles liberados por células activadas inmunológicamente y que van a encontrar receptores en las células del sistema nervioso.

No es una sorpresa que la respuesta inmune es también sujeto de control neuroendocrino. Los altos grados de versatilidad de ambos sistemas: inmune y nervioso central sugieren un complejo trabajo involucrando diferentes tipos de células y estructuras, capaz de emitir y recibir señales bidireccionales. Este concepto ha permitido una visión más integrativa de la inmunoregulación.

Usando la amplia diversidad de receptores de reconocimiento de lo propio y no propio, las células inmunes activadas deben tener mecanismos para poder llevar mensajes al cerebro o a estructuras cerebro-controladas. Uno puede imaginar un código basado en combinaciones de mensajeros solubles, producidos por las células del sistema inmune, los cuales podrían informar al sistema nervioso central acerca del sitio de la respuesta inmune en operación y de su intensidad. Información acerca del lugar de una respuesta inmune podría ser transmitida por estimulación de las fibras nerviosas de órganos linfoides como los ganglios que están estratégicamente localizados. Pero,

por el otro lado, la existencia de un nivel de regulación neuroendocrina sobre el sistema inmune implica que las células de éste sean un órgano receptor.

Si la intervención del cerebro ocurre, el cual puede depender de un programa homeostático, la respuesta regulatoria sería el resultado de señales neuroendocrinas externas y señales autorregulatorias inmunológicas. No existe duda que varios mecanismos eficientes autoregulatorios existen, (por ejemplo, linfocinas y monocinas regulatorias) los cuales confieren grados de autonomía al sistema inmune³.

1.1.7 LOS MENSAJEROS QUÍMICOS DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO.

El sistema nervioso central, el sistema endocrino y el sistema inmunológico en conjunto forman un complejo sistema de integración funcional llamado: el sistema neuroinmunoendócrino, el cual permite la sobrevivencia y la adaptación de las especies a los diferentes ecosistemas.

El sistema neuroinmunoendócrino está formado por distintos tejidos entre los que destacan el hipotálamo, las glándulas endocrinas (hipófisis, tiroides, adrenales, gónadas, páncreas, etc.), y el tejido linfoide. Estas estructuras regulan el crecimiento, la alimentación, la reproducción, la conducta sexual, los niveles de electrolitos, las respuestas al estrés e inmunológica, entre otras, a través de distintos mensajeros químicos con diferentes estructuras y mecanismos de acción.

Entre los mensajeros químicos del sistema neuroinmunoendócrino se encuentran diversos neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas hipofisarias y del aparato digestivo, hormonas esteroides y citocinas.

Aunque los mensajeros fueron aislados y purificados del sistema nervioso, el endocrino o el inmunológico, actualmente se sabe que los diferentes mensajeros químicos pueden ser producidos de una manera compartida por los diversos tejidos en donde ejercen diversas funciones. Diferentes mensajeros químicos pueden regular varios eventos bioquímicos relacionados con alguna función en particular, en la misma célula.

Las citocinas, particularmente las interleucinas, son los principales mensajeros químicos del sistema inmune. Una gran parte de ellas es producida por los macrófagos y los linfocitos. Conviene tener presente que los macrófagos forman parte de la microglía en el cerebro y que éste no solo produce las principales citocinas del sistema inmune sino que también sus neuronas y células de la glía pueden expresar receptores para las mismas. Pero el sistema inmune también puede producir hormonas y varios neurotransmisores.

El conocimiento que se tiene hasta el momento de los mensajeros químicos de los sistemas nervioso, inmune y endocrino ha permitido empezar a entender cómo se llevan a cabo diversas funciones vitales para los organismos, tanto en condiciones normales como patológicas, lo cual ha llevado a establecer diferentes terapias para las distintas enfermedades en las que están involucrados los tejidos que conforman este triple sistema. Como por ejemplo, los mensajeros del sistema gastrointestinal que mejoran las condiciones necesarias para permitir la digestión y la absorción eficientes de proteínas, carbohidratos y grasas del lumen del intestino o las citocinas que participan en la respuesta al estrés, la reproducción y el sueño¹. Estas terapias se basan en el conocimiento de la estructura de los mensajeros químicos, su metabolismo y su mecanismo de acción.

La importancia de la comunicación del sistema neuroinmunoendocrino esta basado primeramente en la evidencia de receptores comunes para neuropéptidos transmisores, hormonas y citocinas, así como una íntima asociación anatómica entre los elementos de los tres sistemas. El significado funcional de la interacción neuroinmunoendócrina puede ser la coordinación de un complejo mecanismo de eventos celulares y subcelulares, incluyendo no solo los compartimentos linfoides, sino también la musculatura y, seguramente, la circulación sanguínea.

La inmunoregulación neuroendocrina no puede ser imaginada sin señales aferentes originadas en el propio sistema inmune. La necesidad de conexiones aferentes, es algo que ya ha sido descubierto (Besedovsky) y se refleja en los cambios neuroendocrinos durante la respuesta inmune. La existencia del factor incremento-glucocorticoide (GIF) originado en células linfoides y su acción integrativa en niveles del axón hipotálamo-pituitario ha sido demostrada³. Sobrenadantes de células del bazo

estimuladas con Con-A tienen la propiedad de disminuir la actividad de neuronas noradrenérgicas³.

Sustancias como la histamina, el óxido nítrico y la serotonina, neurotransmisores clásicos que son liberados durante ciertos tipos de respuesta inmune, podrían también actuar como mensajeros. Es sabido que los precursores de estos mediadores pueden cruzar la barrera hematoencefálica. Más recientemente, se ha mostrado que, las células linfoides pueden producir ACTH y sustancias como endorfinas. Estos agentes podrían por eso, también actuar como mensajeros inmunes.

Los anticuerpos también pueden ser considerados candidatos para mediación de interacciones inmune-neuroendocrinas.³

1.1.8 LOS AGENTES NEUROENDOCRINOS QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD CELULAR INMUNE.

Ya hemos mencionado que son muchos los datos experimentales que muestran como, lo mismo que todas las células del cuerpo, las células inmunes, con su extrema versatilidad y sus complejas tareas, no se escapan de las influencias neuroendocrinas. El control del metabolismo y la proliferación de las células inmunes está bajo la influencia de hormonas y neurotransmisores. Algunos ejemplos pueden ser suficientes para ilustrar qué agentes neuroendocrinos pueden trabajar a los niveles más refinados.

La expresión de antígenos de histocompatibilidad necesarios para restringir interacciones entre células inmunes puede ser afectada por hormonas (por ejemplo glucocorticoides). La producción de varias linfocinas y monocinas puede ser afectada por ciertas hormonas. Ya ha sido demostrado que hormonas, neurotransmisores y también neuropéptidos son capaces de influenciar pasos esenciales de la respuesta inmune. Además, la manipulación cerebral y el estímulo psicosocial puede resultar en influencias sutiles en la conducta de las células inmunológicas.

Las hormonas son relevantes para la inmunoregulación bajo condiciones fisiológicas. Los siguientes datos son las primeras evidencias de este mecanismo regulador. Después de los cambios introducidos por la estimulación antigénica, los

niveles sanguíneos de glucocorticoides se observaron incrementados en una forma paralela con el desarrollo de la respuesta inmune. Los niveles que alcanzan estas hormonas tienen un efecto inmunosupresor y además son capaces de suprimir la respuesta a antígenos no relacionados.

Uno puede esperar que la estimulación *in vitro* de las células del sistema inmune libera mediadores, los cuales cuando se inyectan en animales normales, afectan la glándula adrenal en una manera similar a la observada en animales inmunizados. Algunos tipos de experimentos fueron diseñados usando sobrenadantes obtenidos de células inmunológicas estimuladas *in vitro* con Concanavalina A (Con-A). Por consiguiente, la inyección de mediadores derivados de células inmunológicas pueden imitar los eventos ocurridos después de la inyección del antígeno³.

Otro modo de producción de un factor derivado de una célula inmune, el cual puede incrementar los niveles en sangre de glucocorticoides, consiste en un co-cultivo *in vitro* de leucocitos de sangre periférica humana (HPBL) con el virus de Newcastle (NDV). Después de remover el virus, el sobrenadante fue inyectado en ratas. El incremento de los niveles de glucocorticoides obtenido con sobrenadantes de cultivos de HPBL infectados con NDV fue paralelo a un incremento de ACTH. Otros autores³ han demostrado que linfocitos de ratones infectados con NDV pueden producir una sustancia similar al ACTH.

1.1.9 INMUNOREGULACIÓN SIMPÁTICA.

La inervación simpática media un mecanismo regulador que restringe a las células inmunológicas de sus actividades (interesantemente, los resultados obtenidos hasta ahora de las investigaciones al respecto no permiten decidir si algunos efectos reflejan la existencia de inmunoregulación simpática) Por consiguiente, se ha analizado si la actividad de los nervios simpáticos, medida a través de los niveles de noradrenalina (NA), cambia o no durante la respuesta inmune. Los resultados obtenidos constituyen una evidencia definitiva de que un cambio significativo en el sistema simpático es reflejado por un decremento del contenido de NA del bazo, ocurriendo en el medioambiente de las células inmunológicas. El decremento de NA esta inversamente relacionado a la magnitud de la respuesta³. Tomando junto con los datos descritos en

inervación y efectos de agonistas, este decremento en NA puede esperar que afecte el desempeño de las células inmunológicas.

Como los animales están desarrollando constantemente respuestas inmunes contra los antígenos medioambientales, el grado basal de la actividad de nervios simpáticos puede ser influenciado por los grados de actividad inmunológica. Animales libres de microbios (*Germfree GF*) y libres de patógenos específicos (*specific pathogen-free SPF*) ofrecen un excelente modelo de estudio de niveles basales de catecolaminas en órganos linfoides.

Se ha observado que los linfocitos T pueden influir en el desarrollo de la inervación simpática del bazo. En ratones “desnudos”, sin Timo, los linfocitos T inmaduros se pueden detectar en la región periarteriolar de la pulpa blanca del bazo, las fibras nerviosas simpáticas penetran esta área durante el desarrollo y liberan cantidades cada vez mayores de NA. Se ha detectado que el bazo de los ratones desnudos (*nu/nu*) tienen un contenido significativamente mayor de NA que los timos en los ratones desnudos (*un/+*)³. La implantación del timo en el nacimiento, revierte esta situación.

1.1.10 INMUNOREGULACIÓN A UN NIVEL HIPOTÁLAMICO.

El hipotálamo controla numerosas funciones pituitarias y autonómicas. Sobre los datos escritos acerca de la intervención del sistema nervioso y la pituitaria en la inmunoregulación, los resultados que se tienen hasta ahora sugieren que la respuesta inmune puede evocar respuestas hipotálamicas.

Es bien conocido que las vías cerebrales aminérgicas modulan la actividad de neuronas hipotálamicas. En este orden se ha estudiado si los caminos noradrenérgicos del cerebro son afectados por la respuesta inmune y sus productos. En un estudio, los productos solubles derivados de células inmunológicas median cambios de NA en el hipotálamo. Estos productos se administraron a ratas, dos horas después de la inyección, los sobrenadantes de células del bazo fueron estimuladas con Con-A *in vitro*, la concentración de NA en el hipotálamo fue reducida cuando se compararon con los sobrenadantes obtenidos de células linfoides no estimuladas. Se interpretan estos resultados como la evidencia de que la activación de las células inmunológicas conduce

a un decremento en la proporción de la síntesis de NA en el hipotálamo, el cual es posible mediar a través de un factor liberado por células inmunológicas³.

El hecho de que la síntesis de NA hipotálamica es inhibida durante la respuesta inmune permite ahora intentar integrar la evidencia descrita. La evidencia presentada muestra que la respuesta inmune puede, por sí misma, unir respuestas neuroendocrinas con efectos inmunoregulatorios. Algunas de estas respuestas pueden ser atribuidas a mensajeros solubles derivados de células inmunológicas. Se ha definido a la respuesta inmune como una respuesta homeostática que esta sujeta a niveles de regulación neuroendocrina como ocurre con otros mecanismos homeostáticos. Este concepto implica que existen canales de información aferente entre células inmunes y el cerebro.

1.2 Neurotransmisores

1.2.1 GENERALIDADES SOBRE LA COMUNICACIÓN INTER-NEURONAL

Las neuronas se comunican entre sí mediante conexiones intercelulares conocidas como sinapsis. Además de la sinapsis que una neurona establece con otra, algunas neuronas también forman sinapsis con fibras musculares o con células secretoras. Las sinapsis se dividen, por su morfología y mecanismo de acción en: sinapsis eléctrica y sinapsis química. En la primera, las neuronas están acopladas por medio de uniones comunicantes (*gap junction*) por las que pasan iones y la información se propaga directamente de una célula a otra, mientras que en la sinapsis química, participan mensajeros químicos llamados neurotransmisores.

Existen más de 100 neurotransmisores que por lo general son moléculas de bajo peso molecular y estructura sencilla que se sintetizan y se liberan desde la célula presináptica e interactúan con receptores proteínicos localizados en la célula postsináptica. Esta interacción del neurotransmisor con su receptor permite que el primero ejerza sus acciones comunicando una célula con otra. La síntesis de los neurotransmisores está dada por la presencia de enzimas correspondientes en la terminal presináptica y por la disponibilidad de sus cofactores. Una vez liberados los neurotransmisores, son degradados en el espacio sináptico o bien son recapturados en las células gliales o por la neurona presináptica. En la presinapsis existen además autoreceptores que regulan la cantidad de neurotransmisor que será secretado.

El tipo de sinapsis (excitadora o inhibitora) depende tanto del neurotransmisor liberado como de los iones a los que la membrana postsináptica aumenta su permeabilidad por la acción del neurotransmisor sobre su receptor específico. Así, neurotransmisores excitadores, como el glutamato, la acetilcolina (ACh) y la serotonina, abren canales selectivos a cationes (Na^+ , Ca^{2+}), con la consecuente despolarización de la membrana postsináptica. Mientras que los neurotransmisores inhibidores como el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina abren canales selectivos para aniones (Cl^-), provocando un hiperpolarización de la membrana.

Los receptores para los neurotransmisores son proteínas integrales de

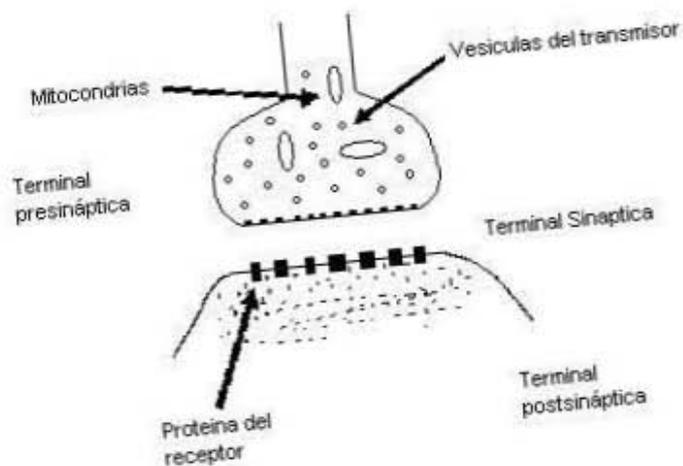
membrana de dos tipos: los receptores ionotrópicos que conforman ellos mismos un canal iónico y los receptores metabotrópicos que son aquellos que están acoplados a una cascada de segundos mensajeros (AMPc, DAG, IP3, GMPc) mediada por proteínas G, los cuales no solo afectan la permeabilidad de algunos canales iónicos, sino que además modifican otros procesos celulares.

1.2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA SINAPSIS.

La sinapsis es el lugar de transmisión del impulso nervioso entre dos neuronas. La membrana celular que rodea las terminales presinápticas y que se llama membrana presináptica contiene gran número de canales de calcio dependientes de voltaje. Cuando un potencial de acción despolariza la terminal, muchos iones de calcio pasan por estos canales y se vacían en la terminal. La cantidad de sustancia transmisora que se libera en la hendidura sináptica está directamente relacionada con el número de iones de calcio que penetra en la terminal. Cuando los iones de calcio penetran en la terminal presináptica, se supone que se unen a las moléculas de proteínas que se encuentran en la superficie interna de la membrana presináptica y que se llaman sitios de liberación. Esto, a su vez, hace que las vesículas del transmisor situadas en lugares próximos se unan también a la membrana, se fusionen con ella y finalmente, se abran al exterior mediante el proceso llamado exocitosis. La transmisión es unidireccional.

Un sinaptosoma es una preparación de laboratorio de la sustancia particulada de la sinapsis de una neurona que se obtiene por homogeneización de tejido cerebral o de la médula espinal. Las membranas de las terminales de las células nerviosas, desprendidas durante el proceso, se cierran formando organelos artificiales osmoticamente activos, que mantienen los niveles interiores de K^+ y Na^+ y presentan una diferencia de potencial normal a través de la membrana.

La membrana de la neurona postsináptica contiene gran cantidad de proteínas del receptor: 1) un componente de fijación; 2) un componente ionóforo, el cual puede ser de dos clases: i) un canal que deja pasar determinadas clases de iones o, ii) un activador de segundo mensajero que penetra en el citoplasma celular y activa, dentro de la neurona postsináptica, una o más sustancias. Estas sustancias a su vez sirven como segundos mensajeros y son capaces de modificar determinadas funciones celulares.



Anatomía fisiológica de la sinapsis

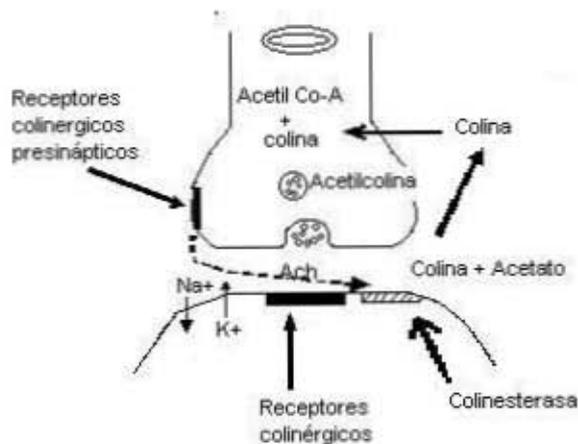
(Tomado de Guyton, Hall., *Tratado de Fisiología Médica*. 9ª. Edición. McGraw-Hill Interamericana.

Pp.615-619, 623)

1.2.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS CANALES IÓNICOS.

Los canales de los iones situados en la membrana de la neurona postsináptica suelen ser de dos clases: 1) canales de cationes que permiten el paso casi siempre de los iones de sodio y 2) canales de aniones que permiten sobre todo el paso de los iones cloro.

Los canales de cationes por donde pasan los iones de sodio están bordeados de cargas negativas. Estas cargas atraen a los iones de sodio con carga positiva y los hacen pasar por el canal cuando el diámetro del mismo aumenta de tamaño. Pero estas mismas cargas negativas repelen a los iones cloro y a otros aniones, impidiéndoles el paso. La apertura de los canales de sodio excita a la neurona postsináptica. La sustancia transmisora que abre los canales de sodio se llama transmisor excitatorio. (Por ejemplo, acetilcolina). El elemento presináptico contiene un gran número de vesículas que almacenan el transmisor; en la parte terminal del axón están las vesículas que contienen el neurotransmisor. La estimulación nerviosa libera acetilcolina que, difundándose a través de la hendidura, provoca un cambio en la permeabilidad de la membrana después de la unión con su receptor.



Terminal nerviosa colinérgica indicando la síntesis, el almacenamiento y la liberación de acetilcolina (ACh), y su hidrólisis por la colinesterasa y su acción sobre receptores colinérgicos en la célula efectora y los receptores presinápticos

(tomado de Goth Andrés. *Farmacología Médica. Principios y conceptos*. 8^a. Edición. Ed. Interamericana, 1977, pp.48-58)

En cuanto a los canales de aniones, cuando su diámetro se vuelve lo bastante grande, los iones de cloro lo atraviesan pasando al lado contrario, mientras que los cationes de sodio, potasio y calcio quedan bloqueados. Los canales de cloro abiertos inhiben a la neurona y las sustancias que los abren se llaman neurotransmisores inhibitorios.

1.2.4 ASPECTOS GENERALES DE LA NEUROFARMACOLOGIA.

Las neuronas del cuerpo humano se comunican entre ellas por impulsos eléctricos y a través de mediadores químicos que se conocen como neurotransmisores. Sin embargo, sus efectos sobre estructuras periféricas solo los ejercen liberando los neurotransmisores y no por impulsos eléctricos.

En las porciones periféricas del Sistema Nervioso Autónomo, los neurotransmisores que desempeñan un papel predominantemente son la acetilcolina (ACh) y la noradrenalina (NA). En cambio, dentro del Sistema Nervioso Central se admite que los neurotransmisores principales son ACh, NA, dopamina y serotonina. La glutamina también puede ser un neurotransmisor importante en el cerebro. Algunos aminoácidos naturales también tienen propiedades de transmisor. Los ácidos L-Glutámico y L-Aspártico excitan las membranas postsinápticas de muchas neuronas. El

ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina son neurotransmisores inhibitorios naturales.

Gran número de drogas (por ejemplo los cannabinoides de la marihuana) imitan o modifican la acción de los mediadores químicos y pueden clasificarse como agentes neurofarmacológicos.

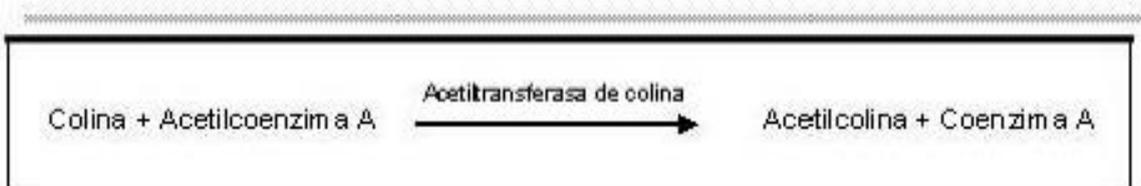
1.2.5 CONCEPTO DE NEUROTRANSMISIÓN QUÍMICA.

Cannon y Uridil⁵ comprobaron que la estimulación nerviosa simpática del hígado libera una sustancia similar en diversos aspectos a la adrenalina. Este mediador, que se llamó primero “simpatina”, hoy se cree que es la noradrenalina. La identificación de ésta como neurotransmisor en los axones adrenérgicos la proporcionó Von Euler⁵.

La acetilcolina fue estudiada sistemáticamente por Dale. La “hipótesis del cuanto” de liberación de acetilcolina y el papel de las vesículas sinápticas en la transmisión neuromuscular y sináptica, es una contribución de Katz y colaboradores⁵.

Los neurotransmisores mejor conocidos son bases nitrogenadas sintetizadas por las neuronas a partir de precursores, y almacenadas en vesículas, prontas para ser liberadas. Las aminas activas no cruzan bien la barrera hematoencefálica, pero si la cruzan los aminoácidos precursores.

Acetilcolina (Ach)- Es un neurotransmisor importante porque se halla tanto en las terminaciones de los nervios periféricos como en las terminaciones nerviosas del cerebro (sinaptosomas). La acetilcolina es sintetizada por la enzima acetiltransferasa de colina, que antes se denominaba acetilasa de colina, según la siguiente reacción:

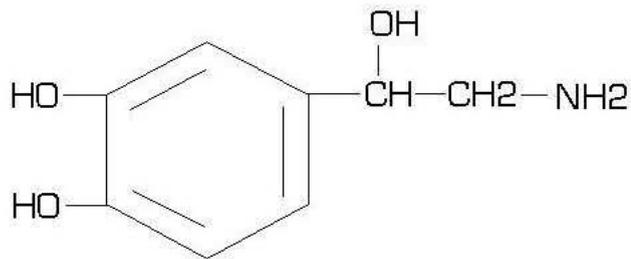


Es secretada por las neuronas en muchas áreas del encéfalo, pero específicamente, por las grandes células piramidales de la corteza motora, por las

motoneuronas que inervan los músculos esqueléticos, por las neuronas preganglionares del sistema nervioso parasimpático y por algunas neuronas posganglionares del sistema nervioso simpático. Tiene un efecto excitador. Tradicionalmente la acetilcolina se ha valorado por métodos biológicos utilizando un músculo esquelético como el recto abdominal de la rana o el músculo liso del íleon del cobayo como elemento de prueba.

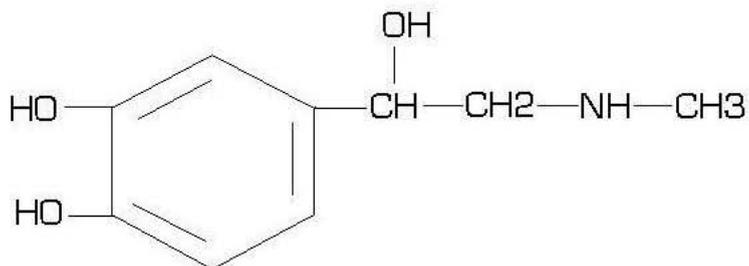
La Ach liberada por un impulso nervioso debe ser destruida rápidamente para que pueda actuar el impulso siguiente en una membrana postsináptica prepolarizada. La destrucción de la acetilcolina se logra por las colinesterasas, que son de dos tipos. La acetilcolinesterasa o colinesterasa específica, hidroliza los ésteres acetílicos de la colina más rápidamente que los ésteres butíricos. La pseudocolinesterasa o la colinesterasa no específica, se llama a veces butirilcolinesterasa porque hidroliza los ésteres butíricos y otros de la colina más rápidamente que el éster acetílico. La acetilcolinesterasa está localizada en las membranas neuronales, también en las membranas de glóbulos rojos y la placenta. La colinesterasa no específica está ampliamente distribuida en todo el cuerpo. La colinesterasa plasmática es del tipo no específico. La concentración plasmática de colinesterasa también está disminuida en las enfermedades hepáticas avanzadas, pues la enzima se fabrica en el hígado.

Catecolaminas.- El término colectivo para noradrenalina (norepinefrina, NE, NA, levarterenol, l-noradrenalina, 1-beta [3,4-dihidroxifenil]-alfa-aminoetanol) es el de catecolamina, ya que este neurotransmisor son catecoles (ortodihidroxibencenos) y contienen un grupo amínico en su cadena lateral alifática. Es una hormona de peso molecular 169.18 Da. La NA existe en las fibras adrenérgicas y en algunas vías dentro del Sistema Nervioso Central. Es secretada también en la medula suprarrenal en respuesta a la estimulación del bazo. Es el neurotransmisor químico de la mayor parte de las terminaciones simpáticas. Se encuentra almacenada en los botones sinápticos de las neuronas que la secretan. Sus principales metabolitos son la normetanefrina y el ácido vainillinmandélico. Es un agonista sobre las células efectoras, es un agonista potente en los receptores α y tiene poca acción sobre los receptores β_2 . Las dosis pequeñas de NA no producen vasodilatación ni disminuyen la presión arterial, ya que los vasos sanguíneos del músculo esquelético se constriñen, en lugar de dilatarse.



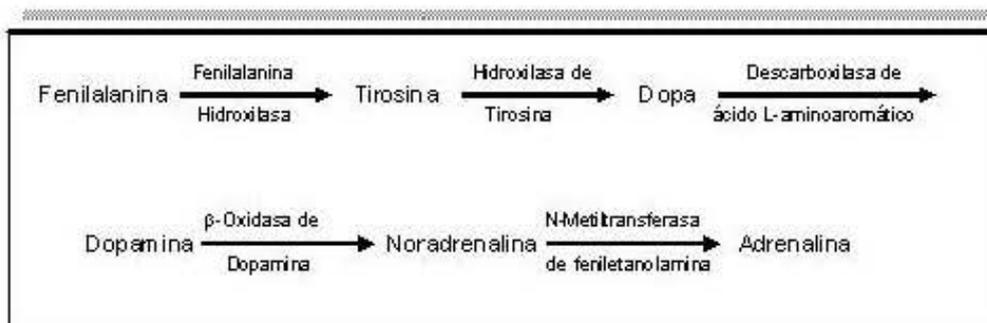
NORADRENALINA

La adrenalina (A) (isomero L del β - (3,4-dihidroxifenil)- α -metilaminoetanol) es la catecolamina que existe en mayor proporción en la medula suprarrenal del cuerpo humano (en el adulto, la adrenalina constituye aproximadamente 80% de las catecolaminas de la medula suprarrenal). Es una hormona de peso molecular 183.20 Da. Es un derivado metilado de la NA. Es inestable en solución alcalina y con exposición al aire o a la luz, tomando un color rosado al oxidarse a adenocromo y luego pardo, por la formación de polímeros. Es secretada por muchas neuronas cuyos somas celulares están situados en el tronco encefálico y el hipotálamo y por la médula suprarrenal. Es liberada principalmente en respuesta a hipoglucemia, temor, angustia, estrés. Su acción está mediada por la presencia de receptores α o β en las células efectoras. La determinación de los niveles plasmáticos y urinarios y sus metabolitos es útil para establecer el estado funcional de la médula suprarrenal. Dosis muy pequeñas (0.1 μg) pueden hacer que la presión caiga. Los usos más comunes de la adrenalina son para aliviar la dificultad respiratoria, sus efectos cardiacos pueden ser útiles para reestablecer el ritmo cardiaco.



ADRENALINA

La biosíntesis de las catecolaminas es por hidroxilación y descarboxilación de los aminoácidos fenilalanina (Phe) y tirosina. Las diversas etapas en la biosíntesis de las catecolaminas son las siguientes:



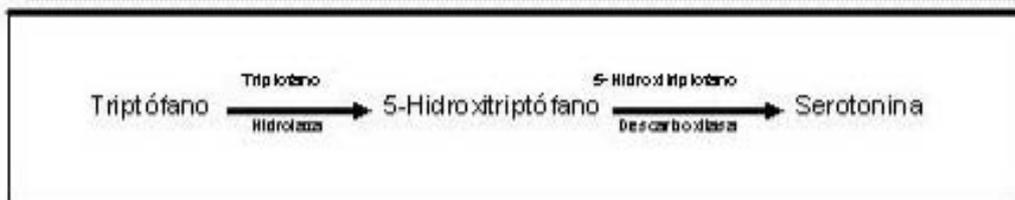
La fenilalaninohidrolasa se encuentra principalmente en el hígado. La hidrolasa de tiroxina es una enzima citoplasmática que cataliza el ritmo de producción de la biosíntesis de las catecolaminas. Así pues, la inhibición de esta enzima por análogos de aminoácidos, como la α -metiltirosina, origina una disminución de catecolaminas en el cerebro y diversos nervios simpáticos. La descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos es una enzima citoplasmática que descarboxila diversas sustancias además de la dopa, con la cual convierte el 5-hidroxitriptofano a serotonina y la tiroxina a tiamina. La β -oxidasa de dopamina, enzima que contiene cobre, unida a las membranas de los gránulos exoplásmicos, cataliza la conversión de dopamina a noradrenalina. La enzima es inhibida por reactivos del cobre como disulfiram y dietilditiocarbamato. La transferasa de N-metil-feniletanolamina es una enzima citoplasmática que existe sobre todo en la medula suprarrenal, donde cataliza la transferencia de un grupo metilo desde la S adenosilmetionina a la NA para producir A.

La A y NA son metabolizadas en productos biológicamente inactivos por la oxidación y metilación. La primera reacción es catalizada por la monoaminoxidasa (MAO) y la segunda por la catecol-O-metiltransferasa (COMT). La MAO se localiza en la superficie externa de las mitocondrias. La COMT se encuentra en concentraciones elevadas en el hígado y los riñones.

La NA y la dopamina inhiben la hidrolasa de tirosina proporcionando así un control interno del proceso sintético.

En las células pequeñas de los ganglios autónomos y de ciertas partes del cerebro la síntesis de catecolaminas se detiene en la dopamina, la cual es secretada como un transmisor sináptico. Su efecto suele ser inhibitorio. La dopamina liberada es recaptada mediante un mecanismo activo de recaptación y es inactivada por la MAO y la COMT.

Serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT).- se halla en mayor concentración en las plaquetas y las vías gastrointestinales. Se forma por hidroxilación y descarboxilación del aminoácido esencial triptófano. Un aumento en la ingestión de triptófano en la dieta puede aumentar el contenido de serotonina cerebral. Es secretada por los núcleos que se encuentran en el rafe medio del tronco encefálico, y que se proyectan hacia muchas áreas del encéfalo, especialmente a las astas dorsales de la médula y al hipotálamo. Actúa como un inhibidor de las vías del dolor en la médula y es posible que produzca sueño. Después de ser liberada por las neuronas serotoninérgicas, mucha de la serotonina liberada es recaptada por un mecanismo activo de recaptación e inactivada por la monoaminoxidasa para formar el ácido 5-hidroxiindolacético.



Los neurotransmisores ejercen su efecto sobre varias células interactuando con receptores específicos que éstas tienen en la superficie de sus membranas.

En el caso de la Ach, sus receptores pueden ser divididos en dos tipos principales en base a sus propiedades farmacológicas: muscarínicos y nicotínicos. La muscarina imita la acción estimulante de la acetilcolina sobre el músculo liso y las glándulas, estas acciones de la acetilcolina se llaman acciones muscarínicas y los receptores involucrados reciben el nombre de receptores muscarínicos. Los receptores muscarínicos existen en varios músculos lisos, músculo cardíaco y glándulas exocrinas. El receptor muscarínico queda bloqueado en forma competitiva por la atropina y drogas similares.

En los ganglios simpáticos, pequeñas cantidades de acetilcolina estimulan a las neuronas preganglionares y grandes cantidades bloquean la transmisión de impulsos de las neuronas preganglionares. Estas acciones no son bloqueadas por la atropina, pero son imitadas por la nicotina. Por lo tanto, estas acciones de la Ach son llamadas acciones nicotínicas y los receptores son receptores nicotínicos. Los receptores nicotínicos de Ach están localizados en ganglios autónomos y a nivel de uniones neuromusculares esqueléticas. Se llaman nicotínicos porque la nicotina también actúa sobre estos receptores. Los receptores nicotínicos de los ganglios autónomos y los del músculo esquelético no son los mismos. Los efectos de la Ach en los ganglios autónomos quedan bloqueados por el hexametonio, mientras que los receptores de la unión neuromuscular esquelética son bloqueados por la d-tubocurarida y compuestos relacionados.

Los receptores nicotínicos de la Ach están constituidos por un gran acúmulo de placas motoras terminales; es una proteína con peso molecular ligeramente mayor de 250,000. Esta compuesta por cinco subunidades: dos unidades α idénticas, una subunidad β , una γ y una δ . Son canales iónicos con apertura por ligando y su activación produce siempre un incremento rápido (milisegundos) de la permeabilidad celular al Na^+ y al Ca^{2+} , despolarización y excitación. Los receptores colinérgicos nicotínicos también se encuentran en muchas partes del sistema nervioso central. Estos no se conocen por completo. Los receptores colinérgicos muscarínicos son muy diferentes de los receptores colinérgicos nicotínicos. Se han estudiado cinco tipos y todos se acoplan mediante proteínas G a la adenilato ciclasa o a la fosfolipasa C. No todos los receptores son idénticos, por ejemplo el receptor muscular contiene cuatro subunidades definidas en un complejo pentamérico ($\alpha_2\beta\delta\gamma$ o $\alpha_2\beta\delta\epsilon$). Los receptores nicotínicos del SNC se encuentran también en forma de pentámeros. Ante la diversidad de los subunidades receptoras nicotínicas neuronales, se han designado como los subtipos α y β . Son ocho los subtipos de α ($\alpha_2 - \alpha_9$) y cuatro los de β ($\beta_2 - \beta_5$) en el sistema nervioso del mamífero. Aunque no todas las combinaciones de α y β son funcionales. No existe una nomenclatura estándar pero se han designado M_1 y M_5 con base en su especificidad farmacológica. Hay receptores M_1 en los ganglios de diversas glándulas secretoras y también abunda en el cerebro; el M_2 se encuentra en el corazón (miocardio) y parece encontrarse también en el músculo liso; el M_4 existe en todo el páncreas, donde favorece

la secreción de las enzimas pancreáticas y de la insulina; M_2 y M_4 se encuentran en el músculo liso. De los receptores M_3 y M_5 se desconocen sus propiedades farmacológicas y sus efectos fisiológicos.

Las interacciones con los miembros de la familia de proteínas G median las funciones básicas de los receptores muscarínicos. Los subtipos M_1 , M_3 y M_5 activan a la proteína G denominada $G_{q/11}$, que es la encargada de la estimulación de la actividad de la fosfolipasa C; el resultado inmediato es la hidrólisis de polifosfatos del fosfatidilinositol para que se formen polifosfatos de inositol. Algunos de los isómeros de fosfato de inositol producen descargas del Ca^{2+} intracelular desde sus sitios de almacenamiento en el retículo endoplásmico. El segundo producto de la reacción de fosfolipasa C, el DAG, activa a la proteincinasa C (PKC).

Los receptores M_2 y M_4 interactúan con un grupo definido de proteínas G (en particular las denominadas G_i y G_o) con inhibición resultante de la adenilatociclasa (AC), activación de los canales de K^+ operados por receptores y supresión de la actividad de los canales del Ca^{2+} .

De la activación de receptores muscarínicos pueden resultar otros acontecimientos celulares, como la descarga de ácido araquidónico y la activación de la guanidilatociclasa.

Hay receptores muscarínicos y nicotínicos también en el sistema nervioso central. La adrenalina y noradrenalina actúan ambas sobre receptores α y β . La noradrenalina tiene mayor afinidad para receptores adrenérgicos α y la adrenalina para receptores adrenérgicos β . Las drogas que bloquean estos receptores se llaman agentes bloqueadores adrenérgicos α y bloqueadores β . Los receptores adrenérgicos constituyen una familia de proteínas sumamente relacionadas. Los receptores adrenérgicos son glucoproteínas integrales de la membrana, con siete dominios transmembranales, una asa de interconexión, un extremo amino extracelular glucosilado y un extremo carboxilo citoplasmático. Tanto en estructura como en función, se relacionan también con los receptores de gran variedad de otras hormonas y neurotransmisores que se acoplan a proteínas G. Todos los receptores β -adrenérgicos estimulan la adenilatociclasa; la interacción entre el receptor y la enzima no está dirigida

pero sí mediada por una proteína G denominada G_s . La estimulación del receptor conduce a la acumulación del AMPc, la activación de la proteincinasa AMPc dependiente y la alteración funcional de numerosas proteínas celulares como resultado de su fosforilación. Además, el G_s puede aumentar directamente la activación de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de la membrana plasmática del músculo esquelético y cardíaco.

Los receptores α_2 adrenérgicos inhiben la adenilciclasa al interactuar con proteínas G denominadas G_i ; por ello, las concentraciones intracelulares de AMP cíclico están reducidas y el estado de activación de la proteincinasa AMPc dependiente se encuentra disminuido.

Los receptores β -adrenérgicos se subclasificaron en β_1 (por ejemplo, los del miocardio) y β_2 (músculo liso y la mayor parte de los otros sitios). El receptor adrenérgico β puede hallarse estrechamente asociado con la enzima adenilciclasa. Los receptores α y β son típicamente alargados y unidos a las proteínas G; existen en muchas formas.

Recientemente se ha aislado un gen humano que codifica para un tercer receptor adrenérgico beta (designado β_3). Como este receptor es aproximadamente diez veces más sensible a la noradrenalina que a la adrenalina, y es relativamente sensible al bloqueo por antagonistas como el propranolol, pueden mediar respuestas a las catecolaminas en sitios con características farmacológicas “atípicas” (por ejemplo el tejido adiposo).

La dopamina liberada actúa sobre diversos tipos de receptores. El receptor D_1 activa la adenilatociclasa sensible a la dopamina mediante G_s , el receptor D_2 inhibe la adenilatociclasa mediante G_i . El receptor D_2 también inhibe el metabolismo del IP3.

Se han descrito siete tipos de receptores de la serotonina: $5HT_{1A}$, $5HT_{1B}$, $5HT_{1C}$, $5HT_{1D}$, algunos de las cuales son presinápticos; $5HT_2$, que interviene en la agregación de plaquetas, contracción del músculo liso y varios efectos en el cerebro, receptores $5HT_3$ que se encuentra en el cerebro y tejidos periféricos que intervienen en otras funciones cerebrales y los receptores $5HT_4$ cuyo papel fisiológico todavía se desconoce.

También existen varios tipos de receptores para GABA de los cuales se hará una mención detallada mas adelante.

Cada uno de estos receptores diferentes se puede expresar sobre células distintas y, por consiguiente, su estimulación por el correspondiente ligando se traduce en efecto diferentes por ejemplo:

1.2.6 LUGARES DE ACCIÓN DE MEDIADORES QUÍMICOS.

- La Ach tiene sitios de acción en: las terminaciones nerviosas parasimpáticas posganglionares, a nivel de músculo liso, músculo cardiaco y glándulas exocrinas. También en todas las sinapsis ganglionares autónomas, en las terminales de fibras motoras, a nivel de las uniones neuromusculares esqueléticas.
- La NE tiene sitios de acción en: las terminaciones nerviosas simpáticas posganglionares sobre músculo liso, músculo cardiaco y glándulas exocrinas (con excepción de las terminaciones nerviosas de las glándulas sudoríparas).
- Mientras que en la sinápsis del sistema nervioso central tienen sitios de acción la Ach, NE, dopamina, serotonina, histamina.
- La dopamina tiene sitios de acción en células PIF (células pequeñas intensamente fluorescentes) de los ganglios simpáticos, cuerpo estriado, eminencia media y otras partes del hipotálamo, sistema límbico; partes de la neocorteza, terminaciones de algunas interneuronas de la retina.
- La serotonina tiene sitios de acción en: el hipotálamo, sistema límbico, cerebelo, médula espinal y retina.

La determinación del lugar preciso de acción de diversos neurotransmisores se complica por dos consideraciones principales: 1) algunos de los mediadores pueden actuar también en zonas presinápticas, influyendo en esta forma en la liberación de mediadores, 2) los neurotransmisores pueden actuar en mas de un receptor postsináptico. En las terminales de fibras motoras a nivel de las uniones neuromusculares esqueléticas.

1.3. Características del Ácido γ -aminobutírico (GABA)

1.3.1 EL ÁCIDO γ - AMINO BUTÍRICO (GABA).

A través de los años, algunos aminoácidos se han reconocido como candidatos importantes a neurotransmisores en el sistema nervioso central de mamíferos. Aunque los aminoácidos están presentes en todo el cuerpo como un producto del catabolismo de las proteínas, se ha encontrado que, en el cerebro, algunos de ellos funcionan como neurotransmisores. Los aminoácidos que actúan como neurotransmisores pueden ser divididos en dos grupos: los que tienen efectos excitatorios en la actividad neuronal (como el Glutamato) y los que son inhibitorios (como el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina).

Aminoácidos inhibitorios como el GABA hiperpolarizan las neuronas de los mamíferos. Probablemente los aminoácidos son los transmisores más importantes en el SNC de los mamíferos, en tanto que los otros transmisores Ach, NA, dopamina y 5-hidroxitriptamina probablemente intervengan en la transmisión de un pequeño porcentaje de señales en los sitios sinápticos centrales.

Hasta 1950 los investigadores identificaron a GABA como un constituyente normal y único del SNC de los mamíferos. El GABA imitó los efectos observados con la estimulación de los nervios inhibitorios. La mayor parte de las acciones del GABA en las funciones cerebrales lo caracterizan como un transmisor inhibitorio. Kravitz y colaboradores⁸ demostraron que el GABA era el único aminoácido inhibitorio que se encontraba exclusivamente en los nervios inhibitorios de los crustáceos y que la potencia inhibitoria de los extractos de estos medios se debía a su contenido de este aminoácido. La descarga de GABA se correlacionó, a continuación, con la frecuencia de la estimulación nerviosa.

En el año 1963 se obtuvo un mayor e importante avance en el conocimiento sobre el GABA, con la publicación de un descubrimiento por Kravits, Klover y Potter²⁴, de sus efectos inhibitorios específicos. Ellos encontraron que el GABA imitaba los efectos de la estimulación de los nervios inhibitorios y que era el único aminoácido

inhibitorio encontrado exclusivamente en nervios inhibitorios y en una cantidad adecuada, capaz de producir un estímulo inhibitorio.

GABA ha presentado los cinco criterios clásicos de asignación como un neurotransmisor: Primero, está presente en las terminales nerviosas. Segundo, es liberado por estímulos eléctricos en las neuronas. Tercero, se ha comprobado que existe un mecanismo para terminar la acción de liberación del neurotransmisor. Cuarto, su aplicación a neuronas blanco imita la acción de estimulación nerviosa inhibitoria y, quinto, en las células se han encontrado sus receptores específicos. Una evidencia de desarrollo sugiere un papel para alterar funciones GABAérgicas en desordenes neurológicos y psiquiátricos, incluyendo la enfermedad de Huntington, epilepsia, alcoholismo, esquizofrenia, desordenes del sueño, enfermedad del Parkinson y retraso mental.

1.3.2 SINTESIS Y METABOLISMO DE GABA.

El GABA fue conocido durante muchos años como un producto del metabolismo de las bacterias y las plantas. En los mamíferos el GABA ha sido localizado en el encéfalo y en la médula espinal, el encéfalo contiene grandes cantidades de *ácido glutámico (aproximadamente 8-13 $\mu\text{mol/g}$) que es la fuente principal para el metabolismo del GABA.

Metabolismo de la glucosa: vías participantes. Formación de aminoácidos.

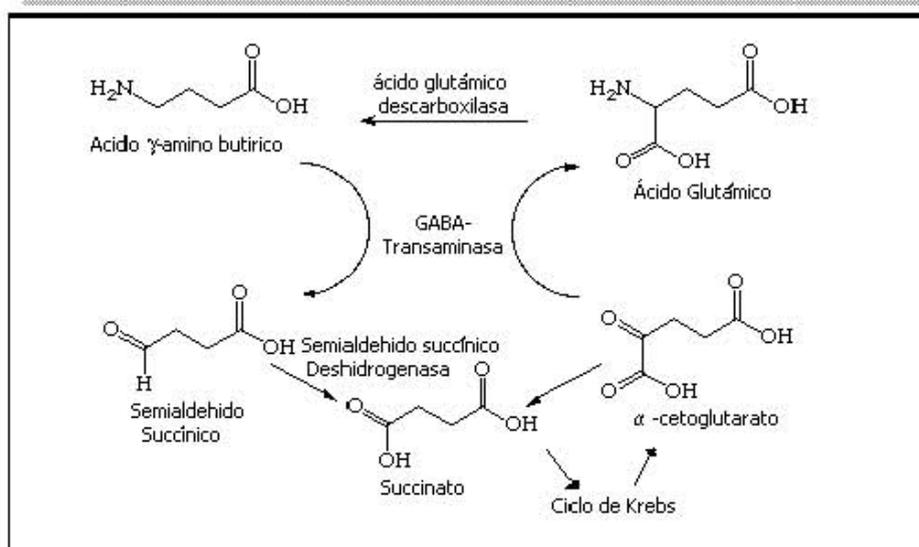
Las vías que participan en la producción de dióxido de carbono, agua, piruvato y lactato a partir de la glucosa son esencialmente las mismas en el tejido nervioso y en los demás tejidos: glucólisis, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa. La vía corta de la hexosa monofosfato, que convierte la glucosa-6-fosfato en 6-fosfonogluconato y fosfatos de ribosas, es relativamente inactiva en el tejido cerebral. Otras propiedades características del metabolismo de la glucosa cerebral son la formación de GABA y la generación de grandes depósitos de glutamato y aspartato

La glucosa es el principal precursor de la producción de GABA *in vivo* aun cuando el piruvato y otros aminoácidos también pueden actuar como precursores.

* El ácido glutámico es un aminoácido polar, cargado, ácido e hidrófilico que también funciona como un aminoácido excitatorio

Estudios con la glucosa marcada con ^{14}C tanto *in vitro* como *in vivo* han indicado que la cadena de carbonos del GABA puede derivarse de la glucosa.

La síntesis del GABA se lleva a cabo a través de una sola reacción: la descarboxilación del ácido glutámico. La enzima responsable de esta reacción es la Glutamato Descarboxilasa (GAD), la cual se encuentra prácticamente confinada al tejido nervioso. El primer paso es la transaminación del α -cetoglutarato, formado del metabolismo de glucosa en el ciclo de Krebs por GABA α -oxoglutarato transaminasa o GABA-transaminasa (GABA-T) en ácido L-glutámico o glutamato. La ácido glutámico descarboxilasa (GAD) cataliza la descarboxilación del ácido glutámico para formar GABA.



Esta reacción está íntimamente relacionada con el metabolismo oxidativo de los carbohidratos en el SNC donde la formación de GABA es un camino alternativo, el "atajo GABA", que implica su producción a partir de glutamato, su transaminación con α -oxoglutarato por la GABA α -oxoglutarato transaminasa (GABA-T) que produce semialdehído succínico y regenera el Glutamato, y su entrada al ciclo de Krebs como ácido succínico, por medio de la oxidación del semialdehído succínico a través de la succínico-semialdehído-deshidrogenasa. Esta es una ruta normal en el metabolismo de la glucosa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o de Krebs.

Hay tres enzimas primarias que intervienen en el metabolismo del GABA antes de su entrada en el ciclo de Krebs:

Glutámico descarboxilasa (GAD)

GAD es la enzima responsable de la conversión del ácido L-glutámico a GABA. Esta enzima actúa sobre el glutamato y elimina el grupo γ -carbonilo en forma de CO_2 para producir un γ -aminoácido. No se ha demostrado que haya reversión de esta reacción *in vitro* ni *in vivo*. En los organismos de los mamíferos, esta descarboxilasa es relativamente específica, se encuentra en dos formas monoméricas (GAD_{65} y GAD_{67}) en el SNC donde esta presente en concentraciones más elevadas en la sustancia gris y en el tejido retiniano. La localización de esta enzima en el encéfalo de los mamíferos se correlaciona con el contenido del GABA. Se ha encontrado asociada con la fracción sinaptosomal. Parece ser expresada solo en células que usan GABA como neurotransmisor, y se encuentra solo en el citoplasma de las terminales nerviosas que contienen GABA, localizada en las terminales nerviosas en el SNC, en las que se encuentra aparentemente en forma soluble¹⁶.

La enzima tiene un peso molecular de aproximadamente 85 a 90 kDa, su actividad óptima se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 6.5 y utiliza como cofactor al fosfato de piridoxal. La enzima es dependiente de fosfato de piridoxal, pero la unión de la apoenzima con el cofactor es lábil y su saturación no es completa. La posibilidad de que la asociación y disociación del fosfato de piridoxal a la GAD pueda ser importante para la regulación *in vivo* de la síntesis de GABA se apoya en la observación de que la saturación de GAD no es mayor de 35% aproximadamente con fosfato de piridoxal *in vivo* a pesar de que las concentraciones de este cofactor en el cerebro son lo suficientemente altas para activar totalmente a esta enzima.

En experimentos realizados *in vitro*, la actividad de la enzima se incrementa notablemente cuando se agrega la coenzima al medio de incubación. En otros estudios, realizados *in vivo*, se ha observado que la actividad de la enzima disminuye en el cerebro como una consecuencia de la administración de drogas que inhiben la síntesis de la coenzima o como el resultado de una dieta deficiente en vitamina B₆.

La enzima purificada es inhibida por análogos estructurales del glutamato,

agentes que atrapan grupos carbonilos (fosfato de piridoxal), reactivos de sulfhidrilo, compuestos de tiol y aniones como el cloruro. Esta inhibición por aniones puede ser interesante desde el punto de vista fisiológico. Existe la posibilidad de que las variaciones en la concentración de cloruros en una terminación nerviosa específica pueda controlar la formación de GABA. Sin embargo, la GAD aislada del cerebro de mamíferos al parecer no es inhibida por el GABA.

La concentración localizada de GAD se ha demostrado mediante inmunohistoquímica de cortes histológicos, recurriendo a los anticuerpos frente a la GAD purificada. Su selectividad y su correlación con la presencia de la transmisión nerviosa mediada por el GABA indican, de forma consistente, que solo las terminales que liberan GABA contienen esta enzima, por tanto esta sustancia constituye un marcador químico.

Se pensaba que existían dos formas de GAD en distintos lugares del sistema nervioso; GAD I y GAD II. El GAD II se detectó en tejidos no neuronales (corazón, riñón, hígado). La clasificación anterior se basó en el hallazgo de que la forma GAD II resultaba estimulada por aquellos agentes que se unen al carbonilo (por ejemplo, el ácido aminooxiacético) y por el ión cloro, mientras que la otra forma resultaba inhibida por otras sustancias. Los trabajos experimentales posteriores demostraron que este hecho era un artefacto del método analítico utilizado. Cuando se utiliza sustrato purificado, tanto el ión cloro como el ácido aminooxiacético inhiben considerablemente la producción de $^{14}\text{CO}_2$ y la cuantificación de la actividad de la GAD es similar en los diferentes tejidos estudiados. La GAD también se ha encontrado en otros tejidos no neurales.

GABA-transaminasa (GABA-T)

El GABA es transaminado a semialdehído succínico y ácido glutámico por la enzima GABA aminotransferasa o GABA-transaminasa (GABA-T). La transaminación del GABA, constituye una reacción reversible, de manera que si se dispone de una fuente metabólica de semialdehído succínico, es teóricamente posible formar GABA por la inversa de esta reacción. GABA-T tiene una amplia distribución en los tejidos, pero en el sistema nervioso está presente en la mitocondria, aunque el GABA no puede formarse en gran cantidad fuera del SNC; el GABA exógeno puede ser metabolizado con rapidez por el tejido nervioso central y el periférico. Esta enzima se ha encontrado asociada con

la fracción mitocondrial.

Tiene un peso molecular de 109 kDa y contiene dos subunidades idénticas, requiere un pH óptimo de 8.2 y también fosfato de piridoxal. Parece que la coenzima está más íntimamente ligada y saturada a esta enzima que la GAD. La relación en el cerebro de GABA-T/GAD en cuanto a su actividad casi siempre es mayor que uno. Los reactivos de sulfhidrilo tienden a disminuir la actividad de GABA-T¹⁴.

El GABA es metabolizado por las células de la glía en las neuronas postsinápticas. La gabaculina es un potente inhibidor catalítico de la GABA-T y también inhibe a la GAD. Sin embargo la gabaculina tiene un grado adecuado de especificidad, ya que es alrededor de mil veces menos eficaz como inhibidora de la GAD que como inhibidora de la GABA-T. Puede lograrse una inhibición selectiva de la GABA-T *in vivo* con reactivos que contenían grupos carbonilo como la hidroxilamina ((NH₂OH) o el ácido aminooxiacético, el cual aumento las concentraciones de GABA (hasta 500% del control) en el sistema nervioso central¹⁴.

El ácido hidracinopropionico se considera como un potente inhibidor de la GABA-T. Se cree que este compuesto inhibe la GABA-T debido a su gran similitud con el GABA en cuanto a configuración estructural, tamaño molecular y distribución molecular de carga. No puede invertirse su acción inhibitoria por la adición de fosfato de piridoxal.

Ya que tanto la GAD como la GABA-T dependen del fosfato de piridoxal, no es sorprendente que los agentes farmacológicos o estados patológicos que afecten a esta coenzima puedan causar alteraciones en el contenido cerebral de GABA. Pueden producirse convulsiones epilépticas por una falta de esta enzima o por su inactivación. La GAD al parecer es inhibida preferentemente por la transaminasa. Una dieta deficiente de vitamina B₆ en los niños puede provocar convulsiones que responden bien al tratamiento consistente en la adición de piridoxina a la dieta. Sin embargo, muchas observaciones indican que no hay una simple correlación entre el contenido de GABA y la actividad de convulsiva.

Semialdehído succínico deshidrogenasa (SSDH)

El semialdehído succínico (SS) se forma como consecuencia de la acción de la transaminasa sobre el GABA; el primero se oxida bajo el efecto de la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSDH), dando origen al ácido succínico. La distribución regional de la SSDH es paralela a la distribución de la actividad de GABA-T en cuanto a actividad; sin embargo, la deshidrogenasa es alrededor de 1.5 veces más activa. La máxima actividad se ha encontrado en el hipotálamo, en los ganglios basales, la sustancia gris de la corteza y en el techo del mesencéfalo.

La semialdehído succínico deshidrogenasa encefálica (SSDH) tiene una alta especificidad de sustrato y puede diferenciarse de la deshidrogenasa aldehídica no específica que se encuentra en el cerebro. La enzima actúa a un pH óptimo de aproximadamente 9.2. La elevada actividad de esta enzima y la baja constante de Michaelis que permiten que funcione con eficacia aún con bajas concentraciones de sustrato, probablemente explican el hecho de que el semialdehído succínico (SAS) no ha sido detectado como un metabolito endógeno en el tejido neural a pesar del metabolismo activo del GABA *in vivo*. La SSDH tiene también una temperatura de activación de 38° C y Pitts sugirió que su actividad *in vitro* podría ser regulada por la temperatura y que la fiebre podría producir un aumento del flujo a través de la vía metabólica corta del GABA.

Vías metabólicas alternas.

Además de sufrir una transaminación y la entrada subsiguiente en el ciclo de Krebs, al parecer el GABA puede pasar por otras transformaciones en el sistema nervioso central, formando muchos otros compuestos (ver Apéndice 1). Quizá la más simple de estas conversiones metabólicas sea la reducción del semialdehído succínico (un producto de la transaminación del GABA) a γ -hidroxibutirato (GHB). La transformación de GABA a GHB ha sido demostrada en el encéfalo de rata, tanto *in vitro* como *in vivo*. La existencia natural de GHB en el cerebro de los mamíferos ha sido rigurosamente establecida por medio de la cromatografía de gases y espectroscopia de masas, en donde al parecer las más altas concentraciones se encuentran en la sustancia *negra* y en las zonas de los ganglios basales. El GHB es muy importante ya que posee actividades anestésicas.

Algunos investigadores aseguran que otro aminoácido, el ácido γ -amino- β -hidroxibutírico (GABOB), también se encuentra en el cerebro de los mamíferos en concentraciones altas, tanto como 4 μ moles/g. Sin embargo, otros autores señalan que GABOB se encuentra en cantidades mucho menores o su ausencia total. Este compuesto es considerado por algunos como un bloqueador de las convulsiones inducidas experimentalmente en animales. Algunos investigadores aseguran que el GABOB es clínicamente eficaz para prevenir y aliviar las convulsiones epilépticas.

Otros compuestos identificados en el cerebro de mamíferos han sido la γ -amino butirilcolina. Aunque los primeros trabajos la identificaron por cromatografía en papel, posteriormente Kewitz realizó un estudio más riguroso y estimó su concentración en el cerebro de la rata en aproximadamente 80 nmoles/g. Este éster de colina al parecer es resistente a la hidrólisis por la acetilcolinesterasa, en tanto que la butirilcolinesterasa tiene cierta capacidad limitada para hidrolizar esta sustancia a una velocidad más que lenta. Aún cuando produce un efecto depresor prolongado y potente sobre la unión neuromuscular, no han sido extensamente estudiados sus efectos sobre el sistema nervioso central.

La γ -butirotetina es otro compuesto cuya existencia ha sido sugerida para los tejidos de los mamíferos. Ha sido tentativamente identificada en el SNC de los mamíferos formando un complejo con la coenzima A. La acción de la γ -butirotetina semeja a la acción de la acetilcolina, excepto que es mucho menos potente.

El ácido γ -guanidinobutírico también es un metabolito normal del cerebro de los mamíferos y puede actuar como fuente de GABA por medio de una transaminación.

La γ -aminobutirilhistidina (homocarnosina) se encuentra en el cerebro de vaca (10-25 μ g/g), de gatos y perros (1.2 μ g/g) y en el de rana (240 μ g/g) pero aun se desconoce la importancia biológica de este compuesto.

La carnitina, como un metabolito normal que se produce en el cerebro de los mamíferos, tiene una actividad semejante a la acetilcolina.

Finalmente, la γ -aminobutiril-lisina se ha observado exclusivamente en el sistema

nervioso central.

1.3.3 LIBERACIÓN E INACTIVACION DE GABA.

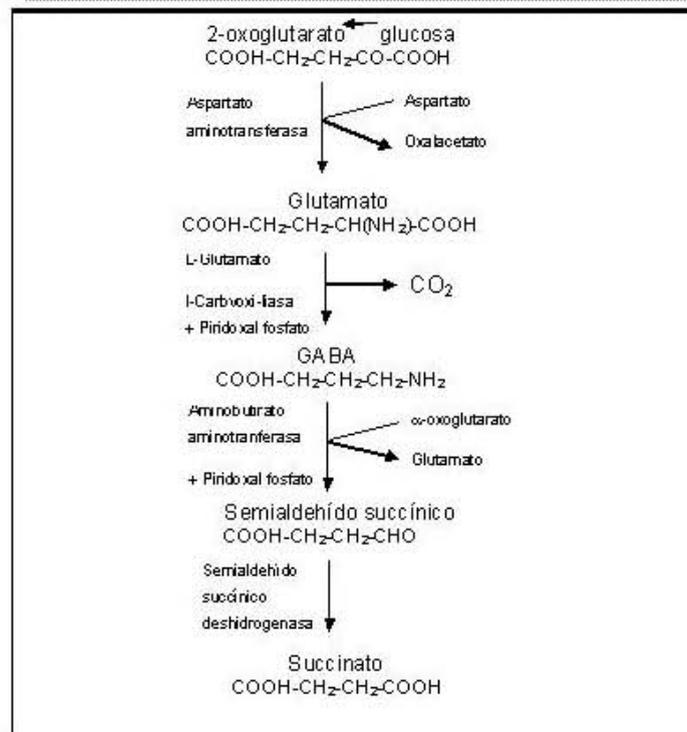
Los estudios típicos con preparaciones *in vitro*, tales como cortes de corteza cerebral, médula espinal o sinaptosomas, han permitido demostrar la liberación de GABA dependiente de Ca^{2+} .

Los estudios de liberación de GABA *in vivo* a partir de la corteza cerebral o de la sustancia negra, en respuesta a estímulos químicos despolarizantes o a la activación de una vía nerviosa, también ofrecen una prueba evidente del papel de neurotransmisor que tiene GABA en estas regiones cerebrales.

Puede inducirse la liberación de GABA endógeno o exógeno acumulado y marcado radiactivamente, en condiciones experimentales adecuadas. El GABA marcado puede ser liberado de cortes cerebrales por estimulación eléctrica o por la agregación de grandes cantidades de potasio en el medio de incubación.

Al parecer no hay un mecanismo farmacológicamente sensible para la rápida degradación del GABA similar al mecanismo de la colinesterasa para la destrucción de la acetilcolina. No se ha establecido ningún mecanismo funcional definitivo de la recaptación para GABA dentro del sistema de los mamíferos. Sin embargo, el GABA es captado activa y eficazmente por los cortes cerebrales y sinaptosomas.

La inactivación funcional primaria del GABA se lleva a cabo por sistemas de transporte. Estos se localizan específicamente en las neuronas que liberan estos compuestos y en las células gliales circundantes. Esta secuencia se conoce como vía corta del GABA.

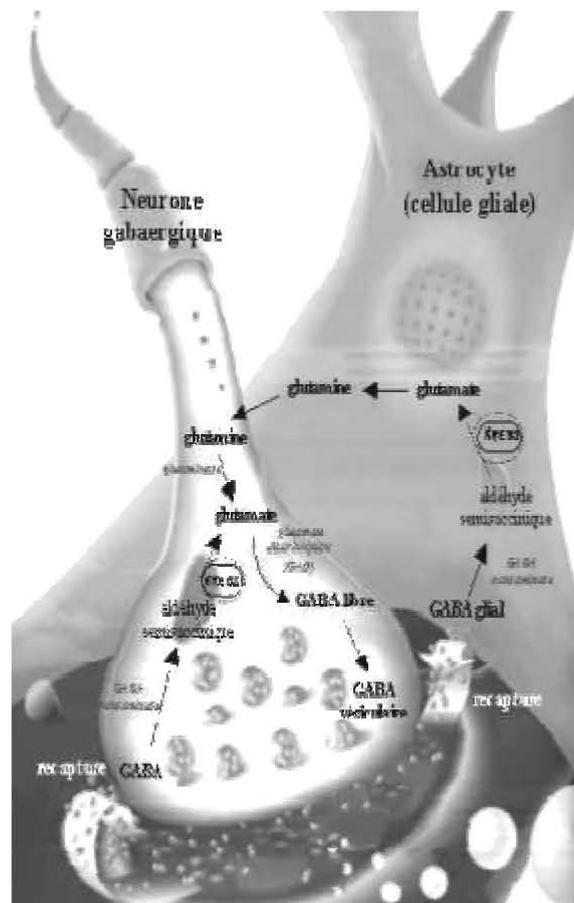


Vía cortocircuito del GABA

La vía corta del GABA.

La vía corta del GABA forma un corto anexo al ciclo del ácido cítrico principal en el cerebro, ofreciendo así una vía alternativa (atajo) entre el 2-oxoglutarato y el succinato. Las reacciones de síntesis y degradación del GABA se encuentran distribuidas en dos compartimentos celulares distintos: la glía (astroglia) y las neuronas. Esta vía es la más activa en el cerebro. Desde el punto de vista de la producción de energía, la ruta a través del atajo no es equivalente a la oxidación directa del 2-oxoglutarato en el ciclo. No se forma GTP y, por lo tanto, tampoco ATP. Se genera un ATP menos cuando el flujo metabólico sigue la vía corta del GABA. Solo del 8 al 10% del flujo a través del ácido cítrico parece seguir el atajo; su función principal es la biosíntesis del GABA en concentraciones elevadas, en la mayor parte de las regiones cerebrales. El mismo atajo no está distribuido universalmente dentro del cerebro, debido a que una enzima clave, la GAD, se halla solamente en aquellas neuronas inhibitoras que liberan GABA como neurotransmisor. Puesto que la GABA transaminasa se localiza en la mayor parte de las neuronas y células gliales, es evidente que todas las enzimas

de la vía corta del GABA estarán presentes dentro de las neuronas GABAérgicas. Pero el GABA liberado en la sinapsis y posteriormente incorporado a la glia circundante, puede completar su transformación dentro de las mitocondrias de estas células, debido a que contienen tanto GABA transaminasa como succinato semialdehidodeshidrogenasa. La glutamina formada pasa a las terminaciones presinápticas donde es el sustrato preferente para la síntesis tanto del GABA como del glutamato, que están vinculados en la transmisión sináptica.



Esquema de la síntesis y metabolismo del GABA en el SNC.

El análisis histoquímico para la localización subcelular de las diversas enzimas que actúan en este atajo muestra que todas ellas, excepto GAD, que es casi exclusivamente neuronal, están localizadas tanto en las mitocondrias de las neuronas como en las células gliales. Así, el ciclo o vía corta que involucra a las células gliales depende de la captación del GABA liberado por las neuronas. Esta vía no es exclusiva, sin embargo, es predominante, ya que la GABA transaminasa está más concentrada en

las células gliales. El GABA-T que es una enzima importante para esta vía corta, depende también del fosfato de piridoxal y su inhibición causa el acumulo de GABA dentro del tejido.

La vinculación del GABA con los mecanismos que controlan la excitabilidad neuronal se hace evidente por los resultados de la manipulación de las dos enzimas que tienen a su cargo la síntesis y la degradación del aminoácido

1.3.4 LA DISTRIBUCIÓN DE GABA EN EL SNC.

El GABA no penetra con facilidad la barrera hematoencefálica. Es difícil, sino imposible, el aumentar las concentraciones encefálicas del GABA, mediante su administración sistémica, a menos que se altere dicha barrera hematoencefálica.

El GABA está ampliamente distribuido en el SNC. Se encuentra presente en altas concentraciones (milimolar) en muchas regiones del cerebro. La concentración más alta se encuentra en el hipotálamo, hipocampo y ganglios basales del cerebro, en la sustancia gelatinosa de la espina dorsal y también en la retina.

En los mamíferos, solo se encuentran trazas de GABA en el tejido nervioso periférico, como en el nervio ciático, nervio esplénico y ganglios simpáticos. Lo mismo en cualquier otro tejido periférico que no pertenece al sistema nervioso, como el hígado, el bazo o el corazón.

El cerebro también contiene grandes cantidades de ácido glutámico (8-13 μ moles/g) que es el precursor más importante del GABA. En las ratas, los cuerpos cuadrigéminos y las regiones diencefálicas contienen las mas altas concentraciones de GABA, en tanto que concentraciones mucho menores se encuentran en la totalidad de los hemisferios cerebrales, la protuberancia anular y la medula espinal. Al parecer hay aumentos progresivos en las concentraciones de GABA y en la actividad de la ácido glutámico descarboxilasa en varias regiones del cerebro durante el desarrollo.

Tipos de células que contienen GABA.

Baekkeskov y colaboradores²³ han identificado la enzima sintetizadora de GABA

(GAD) como un autoantígeno de 64 Kd relacionado con la aparición de enfermedades autoinmunes: la diabetes mellitus insulino dependiente y el síndrome del hombre rígido. En un estudio en 1988, Garry y colaboradores²³ identificaron inmunorreactividad de GABA concentrada en gránulos zimógenos.

Las células nerviosas que sintetizan, almacenan, acumulan específicamente y liberan GABA son generalmente definidas como neuronas GABAérgicas.

En el cerebro, se sabe que GABA está presente en las células de Purkinje del cerebelo. Estas células ejercen una influencia inhibitoria en las neuronas de los núcleos de Deiter en la medula, lo cual sugiere un papel funcional de GABA en el control de los reflejos cerebelosos. Altas concentraciones de GABA también se han encontrado en el ganglio basal, particularmente en la sustancia nigra.

El GABA media las acciones inhibitorias de las interneuronas locales en el cerebro y puede mediar también la inhibición presináptica dentro de la médula espinal. Se han demostrado sinapsis inhibitorias GABAérgicas presuncionales con mayor claridad entre las neuronas cerebelosas de Purkinje y sus blancos en el núcleo de Deiter, también entre las interneuronas pequeñas. El GABA media también la inhibición dentro de la corteza cerebral y entre el núcleo caudado y la sustancia negra. Las células de Purkinje del cerebelo, que recogen las aferencias principales cerebelosas desde el bulbo raquídeo, actúan liberando GABA.

Se han localizado neuronas y terminaciones nerviosas GABAérgicas mediante métodos inmunohistoquímicos que hacen visible a la GAD, enzima que cataliza la síntesis de GABA a partir del ácido glutámico, o mediante hibridación *in situ* de los mRNA para este.

Sistema nervioso parasimpático.- La primera evidencia parcial de la presencia de neuronas GABAérgicas fuera del SNC fue encontrada por Jessen y colaboradores (1979). Estos autores presentaron datos bioquímicos y autoradiográficos indicando que en los plexos mesentéricos del intestino, están concentrados el GABA y su mayor enzima biosintética GAD. Además, el estímulo evoca la liberación de GABA exógeno y endógeno y su dependencia de calcio ha sido demostrada en el plexo del

mesenterio.

Desde ese momento, muchas líneas de evidencia adicional se han acumulado para mostrar que GABA juega un papel de neurotransmisor en estructuras bien definidas en el sistema nervioso gastrointestinal. GABA y GAD han sido localizados en elementos neuronales del tracto gastrointestinal. También se ha demostrado la acumulación de GABA en neuronas de varios segmentos del intestino de diferentes especies. La ontogenia del GABA acumulado en células del duodeno ha sido caracterizada por autoradiografía.

Sistema nervioso simpático.- La demostración de neuronas GABAérgicas en ganglios simpáticos, como el ganglio superior cervical, han sido hallazgos esperados, pensando así en los primeros reportes sobre una función inhibitoria de GABA, porque en los ganglios simpáticos, el GABA exógeno es llevado comúnmente por células gliales y puede ser liberado por estas células del ganglio.

Más recientemente, la disponibilidad de antisueros contra GABA permitió la demostración inmunocitoquímica de GABA en elementos neuronales del ganglio cervical superior y en el ganglio prevertebral. También ha sido encontrado que axones GABAérgicos están distribuidos irregularmente dentro del ganglio cervical superior con una densa innervación GABAérgica del soma y del tallo. Las enzimas GAD y GABA-T han sido localizadas en estructuras neuronales del ganglio simpático.

Otras células nerviosas.- Las evidencias que se han obtenido autoradiográficamente sugieren que varias fibras nerviosas en la glándula tiroides acumulan GABA de manera específica.

En la espinal dorsal, GABA es considerado como un transmisor inhibitorio que media la inhibición sináptica por reducción de la liberación del transmisor de las terminales de las fibras aferentes primarias.

Células gliales.- GABA puede ser liberado de estas células gliales por estimulaciones despolarizantes.

Células endocrinas.- En esta categoría de células que contiene GABA, uno puede encontrar algunos tipos de células que tienen orígenes neuroepiteliales (pinealocitos, células adrenal cromafines).

- Células adrenal cromafines.- En algunas de estas células de la medula adrenal, GAD y GABA-T han sido visualizadas por técnicas inmunohistoquímicas y la captura y liberación de GABA exógeno ha sido demostrado. Estas células derivan de la cresta natural.

- Pinealocitos.- En glándula pineal de varios vertebrados, GABA es localizado comúnmente en estas células.

- Células pancreáticas β .- Okada y colaboradores¹⁶ fueron los primeros en indicar que posiblemente GABA también se puede producir en las células del sistema endocrino, ya que observaron que GABA y su mayor enzima biosintética (GAD) están presentes en altos valores en los islotes pancreáticos. Subsecuentes estudios proporcionaron evidencia inmunocitoquímica de que GABA, GAD y GABA-T están presentes en una población de células beta en el centro de los islotes donde están co-localizados con la insulina. Reusens-Billen y colaboradores²³ en 1984 describieron la localización de sitios de unión de GABA de alta afinidad en el páncreas de ratas neonatales.

- Células folículo-tiroides.- Estudios autoradiográficos revelaron que células del folículo entodermal, en la glándula tiroides, pueden aumentar sus valores de GABA con alta afinidad.

- Células endocrinas de la pituitaria.- GABA y GAD han sido demostrados en diferentes poblaciones de estas células.

Células exocrinas y otras células epiteliales.-

- Exocrinas pancreáticas.- En un reciente estudio, Garry y colaboradores¹⁷ demostraron la inmunoreactividad de GABA en células acinares del páncreas.

- Exocrinas estomacales.- Una mezcla de GABA no neuronal ha sido demostrada recientemente en cortes de tejidos del estomago de rata. En estudios preliminares, la inmunoreactividad de GABA ha sido localizada en los gránulos secretores de la mucosa epitelial gástrica.

- Oviducto.- Autoradiografías de células secretoras epiteliales han mostrado que éstas tienen la capacidad de acumular GABA en una manera específica. Estos niveles de mezcla de GABA podrían ser liberados por despolarización química y eléctrica. Exámenes inmunocitoquímicas han revelado que la mayoría de células epiteliales contienen altos niveles de GABA y GAD.

- Hígado.- La presencia de GABA, GAD y GABA-T en hepatocitos aislados también han sido demostrados por técnicas bioquímicas.

- Riñón.- Goodyer y colaboradores reportaron que una alta afinidad del sistema de captura de GABA esta presente en el borde de las vesículas aisladas del riñón de la rata. Recientemente estos autores han demostrado niveles significantes de GABA y sus enzimas relacionadas en fracciones de células tubulares preparadas de riñón.

- Piel.- Ha sido reportado que GABA está presente en los queratinocitos. En una forma macromolecular, en estas células, GABA tal vez sea formado por putrescina.

Otros tipos de células.-

- Oocitos.- Inmunoreactividad de GAD en oocitos y su incremento durante el ciclo de maduración.

- Espermatozoides.- Mediciones bioquímicas revelaron niveles detectables de GABA en una preparación de espermatozoides.

- Células sanguíneas.- Se ha encontrado que varias células sanguíneas contienen actividad GABA y/o GAD y GABA-T, así como pueden

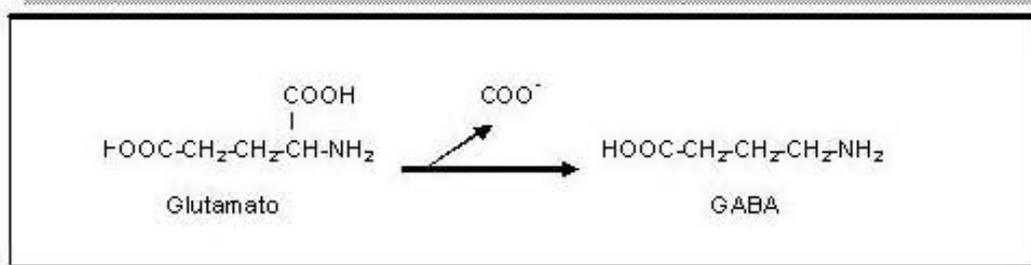
llevar a cabo la captación de GABA específicamente. GABA y GAD están presentes en eritrocitos y GABA-T se encuentra en linfocitos; las plaquetas también contienen GABA y su enzima relacionada, así como una alta afinidad de captación de GABA. Sitios específicos de unión para GABA (Muscimol) y varias benzodiazepinas también han sido identificadas en la membrana de plaquetas.

- Sistema inmune.- La enzima metabolizante de GABA, GABA-T ha sido encontrada en linfocitos. Ha sido demostrado que GABA y GAD están presentes en el timo de roedores. Además, Hall y colaboradores, en 1985, observaron elevados niveles de GABA en el timo durante la respuesta inmune. Reciente evidencia de acción GABA_A-tipo (benzodiazepina) en la respuesta proliferativa de células tímicas de rata en desarrollo y sobre la respuesta proliferativa de linfocitos del bazo de ratón *in vitro* sugieren un fuerte papel para GABA y sus receptores en la respuesta inmune y sus factor potencial de crecimiento.

1.3.5 GABA Y SU FUNCIÓN.

El GABA y el ácido glutámico cumplen una función muy importante como neurotransmisores, en el control de la excitabilidad neuronal. Como consecuencia de su participación clave en estas funciones, una modificación en los mecanismos de síntesis o degradación de los aminoácidos y aminas biogénicas que modifique sus concentraciones en la sinapsis puede llevar a la aparición de estados convulsivos en el caso del GABA y el ácido glutámico.

Los aminoácidos, en particular GABA y el ácido glutámico, tienen a su cargo la comunicación sináptica de los circuitos que controlan la excitabilidad neuronal en la corteza cerebral: el GABA como el principal neurotransmisor inhibitorio y el glutamato como el principal excitador. Cualquier desajuste en el delicado equilibrio funcional de estos dos neurotransmisores genera un estado de hiperexcitabilidad. Es interesante enfatizar que la diferencia en la estructura química de estos dos neurotransmisores es simplemente la presencia de un grupo carboxilo tal como se observa en la siguiente figura:



Estos dos compuestos están íntimamente relacionados pues el glutamato es el precursor inmediato en la síntesis del GABA.

La prueba más importante de que el GABA actúa como neurotransmisor en el cerebro de los mamíferos, se ha obtenido por el registro intracelular que ha demostrado que el GABA causa una hiperpolarización de las neuronas, similar a la inducción por la presencia de la sustancia neurotransmisora natural. El GABA exógeno y la sustancia transmisora inhibitoria endógena, cuando entran en contacto con la membrana postsináptica o los sitios que contienen receptores, provocan que esta membrana se vuelva más permeable al ión cloro. Este aumento en la permeabilidad al cloro puede ser bloqueado en ambos casos por la Picrotoxina y Bicuculina, potentes bloqueadores de los receptores del GABA (A y C).

El GABA funciona como un transmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de los mamíferos. El GABA es considerado como un transmisor inhibitorio, aún cuando puede inducir una respuesta tanto hiperpolarizante como despolarizante. Se cree que ambas acciones son el resultado de un cambio en el receptor de GABA mediado por la conductancia del cloruro. La respuesta despolarizante al GABA predomina en las células de la médula espinal, en tanto que la hiperpolarización inducida por el GABA es típica de las células de la corteza cerebral.

El GABA parece ser el neurotransmisor que actúa sobre el mecanismo conocido como inhibición presináptica, observado principalmente en la médula espinal, los núcleos cuneiformes y gráciles y el tálamo. Este proceso se caracteriza por la despolarización de los aferentes primarios (PAD) después de la llegada de un tren de ondas aferentes a través del aferente inhibitorio. Puesto que la PAD se ve frenada por la

picrotoxina y por la bicuculina, pero no por la estrocnina u otros antagonistas neurotransmisores, parece que el GABA es el agente que posibilita esta inhibición que resulta de una acción despolarizante. El mecanismo iónico involucrado parece ser el canal de Cl⁻, ya que el aumento de las concentraciones de GABA extracelular, a niveles superiores a los normales, cambia el PAD a una hiperpolarización, probablemente por entrada en lugar de una salida de iones Cl⁻.

La acción de GABA en los receptores postsinápticos es la causa de la hiperpolarización; un incremento en el potencial de membrana, el cual reduce la posibilidad de una acción potencial propagada y, por consiguiente, resultando en una inhibición. La hiperpolarización es atribuible a un incremento de la permeabilidad de la membrana nerviosa a los iones cloro. Ahora se acepta que GABA es uno de los principales transmisores inhibitorios en el SNC de los mamíferos.

GABA es inactivado por procesos de alta afinidad, los cuales son dependientes de los iones sodio. Algo de GABA por consiguiente regresa a las terminales nerviosas, donde puede ser metabolizado o reusado.

Ha empezado a reconocerse que GABA juega un papel como neurotransmisor que no solo actúa en el SNC, sino también en otros órganos y sistemas. GABA aparentemente puede actuar como uno de varios factores neurotróficos envueltos en la regulación del desarrollo neuronal en el CNS. Grandes evidencias indican que fuera del cerebro, GABA puede tener diversas funciones, como las tienen otros neurotransmisores.

Funciones de GABA fuera del SNC.

Función neurotransmisora.

Evidencias sugieren que GABA tal vez es un neurotransmisor en la vejiga urinaria y en la vesícula biliar. Además, principalmente a través de líneas de investigación morfológicas (autoradiografía, inmunocitoquímica) se han obtenido evidencias que sugieren que GABA tiene una función importante en la tiroides y en las neuronas perinsulares fuera del páncreas.

Modulación de funciones endocrinas.

GABA está relacionado con las células cromafines de la médula adrenal y, tal vez, ejerce efectos humorales en células circundantes.

Las células beta pancreáticas contienen GABA co-localizado con insulina. GABA puede ser liberado de estas células e interactuar con otras, comúnmente, con células que contienen somatostatina de los islotes.

También han sido encontrados los receptores GABA_A en el estómago, los cuales, tal vez participan en la modulación de la secreción de gástrina y somatostatina.

GABA afecta la liberación del estradiol y la progesterona del ovario de rata. Los niveles de GABA en varios órganos del tracto reproductivo femenino muestran también estar bajo el control de hormonas esteroides. Las concentraciones de GABA en el órgano sexual femenino varían significativamente durante el ciclo estral.

Modulación de funciones exocrinas.

Además, GABA modula la secreción de ácido gástrico en el estómago aislado y la influencia del hígado en la secreción de bilis.

Funciones tróficas (morfogenéticas).

GABA también ejerce efectos morfogenéticos en las neuronas principales del ganglio cervical superior, que inhiben la reorientación del paladar. Este efecto fue imitado por diazepam y revertido por picrotoxina.

Estudios llevados a cabo sobre el GABA pancreático sugiere que GABA tal vez tiene un papel específico en la ontogenia de este órgano.

Los receptores GABA_A han sido encontrados en los órganos reproductores femeninos e incluyen un complejo canal de cloro ionóforo, sensible a benzodiazepina-barbitúrate, similar al receptor GABA_A que se encuentra en el SNC. Se sabe que las benzodiazepinas actúan en este complejo receptor. También ha sido encontrado que interfieren con la ciliogénesis en el oviducto por prevención de la migración de cuerpos basales de la superficie apical. GABA ha sido encontrado concentrado en cinetosomas del oviducto ciliar. Estos hallazgos indican un papel morfogenético de GABA en el oviducto.

Otras funciones putativas.

GABA actúa como un modulador de la proliferación celular y de una serie de eventos acoplados, como los que se mencionan a continuación.

GABA y GAD están presentes en la glándula del timo de roedores y los niveles de GABA se ven incrementados durante la respuesta inmune. Esta observación se puede relacionar con la evidencia de que GABA_A-benzodiazepina influyen en la proliferación de células tímicas y de linfocitos del bazo, todo lo cual sugiere un posible papel de GABA como un modulador inmune.

GABA tal vez está presente en una variedad de tipos de células dentro o fuera del sistema nervioso. Se ha encontrado que GABA estimula síntesis de proteínas en un sistema ribosomal de tejido de cerebro inmaduro, al incrementar la incorporación de aminoácidos en RNAt, al estimular la captura de glucosa en varios tejidos, cambiar la permeabilidad de la membrana mitocondrial y estimular degradación glucogénica en hígado y músculo.¹⁶

1.3.6 FARMACOLOGIA DEL GABA.

GABA muestra acciones inhibitorias potentes. La inhibición mediada por el GABA se halla distribuida de forma más amplia en el sistema nervioso vertebral, lo que está de acuerdo con la distribución del GABA alrededor de los sistemas de transporte de alta afinidad.

Es enorme la cantidad de fármacos que actúan preferentemente sobre los sistemas que son modulados por GABA, comprendiendo una serie de agentes que actúan sobre las diversas fases del metabolismo del GABA, sobre su captación y también sobre los receptores (de los cuales se hará mención mas adelante).

Puesto que tanto la GAD como el GABA-T son dependientes del fosfato de piridoxal, resultan inhibidos por agentes antipiridoxal. Todas las hidracinas inhiben, de forma preferente, la GAD y provocan un descenso en los niveles de GABA cerebral, otros agentes que se unen al carbonilo, por ejemplo hidroxilamina, atacan preferentemente la GABA transaminasa, lo que ocasiona una elevación de los niveles de GABA.

Una amplia serie de compuestos distintos de los agentes antipiridoxal inhibe a la GABA transaminasa. El alquil-GABA, γ -vinil GABA y γ -acetilénico GABA se encuentran entre los más potentes.

La inhibición del catabolismo del GABA de esta forma conduce a una elevación del contenido tisular del GABA. La elevación del GABA provoca un aumento de los procesos neuronales inhibidores y está asociado con un comportamiento de reposo y alejamiento, sueño y protección frente a las convulsiones epilépticas. Esto implica que los elevados niveles de GABA tisular producen concentraciones extracelulares más elevadas, lo que permite al GABA llevar a cabo sus acciones inhibitoras a través de sistemas receptores específicos para el GABA. El ácido diaminobutírico (en las neuronas); β -alanina (en la glía); ácido nipecótico (en ambos) producen un incremento en los niveles de GABA. Un efecto similar puede ser producido por inhibición de la enzima GABA-T, reduciendo el metabolismo de GABA y así su principal acumulación. El ácido amino-oxiacético es un inhibidor de fosfato de piridoxal, también inhibe GABA-T y es un anticonvulsivante.

El bloqueo de la captación de GABA después de su liberación al espacio extracelular conduce también a concentraciones extracelulares más altas de este agente inhibidor. Muchos análogos del GABA son bloqueadores efectivos del transporte del GABA.

El GABA es recapturado en las neuronas presinápticas a través de una familia de transportadores, que son glucoproteínas de 80 kDa con múltiples regiones transmembranales, distintas a los receptores para GABA.

1.4. Receptores de GABA.

1.4.1 ¿QUÉ ES EL RECEPTOR DEL GABA?

El término "receptor del GABA" se refiere a un sitio de reconocimiento de este aminoácido en las membranas postsinápticas. Cuando el GABA o un agonista apropiado se acoplan a ese receptor, inmediatamente cambia la permeabilidad de la membrana a los iones cloruros. Este cambio en la permeabilidad al cloruro ocasiona una hiperpolarización de la neurona receptora en el caso de que la unión del GABA a su receptor se traduzca en una inhibición.

Para entender mejor el concepto de "receptor del GABA" conviene aclarar que el GABA se puede unir a un gran número de receptores que están localizados en las células del sistema nervioso central. Sin embargo, aunque algunos de ellos pueden ser fisiológicamente importantes, en el estricto sentido de la palabra no se les puede llamar apropiadamente receptores de GABA. Un ejemplo de lo anterior son los sitios de transporte de GABA de alta afinidad y las enzimas que intervienen en el metabolismo de GABA como la GAD y la GABA-T.

En el SNC existen receptores de GABA de distintos tipos farmacológicos y funcionales. Así por ejemplo, a pesar de los estudios electrofisiológicos se ha demostrado la existencia de receptores de GABA insensibles a la Bicuculina, que es un antagonista clásico. Por esta razón, muchos investigadores han definido estrictamente a los receptores de GABA en base a su sensibilidad a sus antagonistas más conocidos, la Bicuculina y la Picrotoxina. En vista de la gran cantidad de receptores del GABA en el sistema nervioso central, la opinión general es que estos receptores regulan una gran diversidad de efectos fisiológicos, conductuales y bioquímicos.

Los receptores del GABA pueden controlar las corrientes de Cl⁻ a través de la membrana y su activación conduce casi siempre a la hiperpolarización de la membrana, es decir a una inhibición postsináptica. Los estudios electrofisiológicos²² indican que en la médula espinal, el GABA frecuentemente posibilita una inhibición más prolongada (0,01-0,1 ms) que la atribuida a la liberación de la glicina.

Los receptores de GABA se han subdividido en tres subpoblaciones importantes, A, B y C, teniendo en cuenta sus especificidades farmacológicas, electrofisiológicas y bioquímicas. Se les conoce como receptores GABA_A, GABA_B y GABA_C.

1.4.2 RECEPTOR GABA_A.

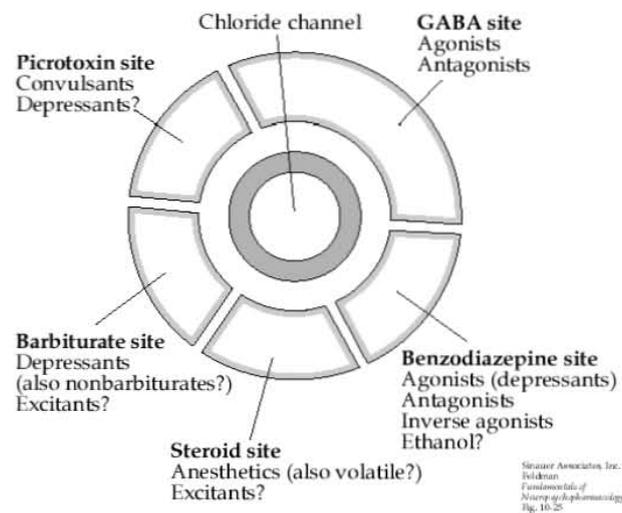
En el SNC, los receptores postsinápticos de GABA que median su clásica acción inhibitoria por medio de cambios en la permeabilidad a iones cloro, son receptores GABA_A. Regulan el movimiento de cloro a través de la membrana, produciendo hiperpolarización o despolarización, dependiendo de la dirección del gradiente de Cl⁻

El receptor GABA_A es una proteína multimérica macromolecular que contiene sitios de unión específicos, para GABA, Picrotoxina, barbituratos, benzodiazepinas, anestésicos, alcohol y neuroesteroides. Estos sitios de unión se encuentran en el canal para los iones de cloro. Han sido reportadas otras drogas, incluyendo anestésicos volátiles, que tienen un efecto sobre el flujo de iones de cloro a través del canal de este receptor. La parte más importante de este complejo es ese canal para Cl⁻ de apertura por ligando que se abre después de la descarga de GABA, a partir de las neuronas presinápticas. Aunque este receptor se encuentra sobre la membrana de las neuronas, también parece existir en células gliales, de tal modo que una gran heterogeneidad de isoformas de receptor han sido encontradas en oligodendrocitos y astrocitos¹⁷. En el cerebro de los mamíferos, los sitios de unión del GABA en el complejo del receptor GABA_A han sido caracterizados en homogeneizados libres de células por uso de ligandos radioespecíficos. El sitio de unión específico del receptor GABA_A está definido como sitio de unión dependiente de sodio que es inhibido por el antagonista bicuculina y donde también puede actuar el agonista Muscimol y que muestra múltiples sitios de alta afinidad. Sin embargo, las afinidades de estos sitios son uno de tres órdenes de baja magnitud que las concentraciones necesitadas (> 1μM) para activar el canal de cloro.

En relación al significado funcional que tiene el GABA, los resultados de diversos estudios sugieren que los receptores GABA_A participan en varios desordenes psiquiátricos y neurológicos y en los mecanismos de acción de numerosos fármacos importantes clínicamente²⁰.

Sitios de unión del receptor GABA_A: Benzodiazepinas, Barbitúricos y Esteroides.

Las funciones del receptor GABA_A pueden ser inhibidas por una sustancia que fue obtenida de una planta convulsivante y que se conoce como Picrotoxina. Esas mismas funciones pueden estar facilitadas por 3 clases de fármacos depresores del SNC: benzodiazepinas, barbituratos y anestésicos esteroides. En la figura siguiente se presenta un esquema del receptor para explicar mejor la variedad de ligandos que pueden influir sobre su canal para los iones de cloro.



(Tomado de Macdonald Roberty I., Olsen Richard W., *GABA_A Receptor channels*. Ann. Rev. Neurosci. 17, 569-602, 1994)

Estructura molecular de la subunidad del receptor GABA_A.

El mayor avance obtenido al determinar la estructura molecular del receptor GABA_A fue el descubrimiento de que una proteína o subunidad del receptor podía ser marcado por fotoafinidad por la benzodiazepina [³H] flunitrazepam¹⁷. El receptor fue reconocido como un miembro de la superfamilia de genes ligando-canal iónico. En esta familia, los receptores tipificados como receptores para acetilcolina nicotínicos forman un complejo hetero-oligomérico, con las paredes de un canal iónico, regiones de la membrana extrínseca y el sitio de unión del neurotransmisor que está presente en el mismo complejo de la proteína. Además del receptor GABA_A-canal de cloro, el receptor para la glicina-canal de cloro y probablemente otros receptores, por

ejemplo receptores de ciertos aminoácidos excitatorios (glutamato) y ATP (Kandel) también parecen ser miembros de esta superfamilia de genes.

El complejo receptor GABA_A-canal iónico es una glucoproteína pentamérica de aproximadamente 275 kDa, compuesta por la combinación de al menos 17 diferentes polipéptidos relacionados estrechamente. Las subunidades son de aproximadamente 50 a 60 kDa y tienen cerca de 20 - 30% de secuencias idénticas entre clases. Las subunidades forman una estructura cuasimétrica alrededor del canal iónico y una porción de cada subunidad contribuye a formar una parte de la pared del canal. El modelo está basado enormemente en analogía con el receptor de acetilcolina-nicotínico (nAChR). Han sido identificadas al menos 6 diferentes variantes familiares de subunidades del receptor GABA_A y han sido nombrados subunidades α , β , γ , δ , ϵ y ρ . Han sido reportadas más variantes de estas subunidades en cerebros de vertebrados, incluyendo α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4} , δ , ϵ y ρ_{1-3} . Las subunidades β_4 y γ_4 hasta ahora han sido identificadas sólo en aves¹¹. Probablemente todas las subunidades de unión de GABA y benzodiazepinas, tienen diferentes afinidades. Los subtipos difieren no solo en localización, sino también en función fisiológica y mecanismos de regulación biológica. La actividad del receptor GABA_A no depende de la presencia de un ión particular y no está asociada con sistemas de segundos mensajeros en una manera directa.

Diversos estudios realizados hasta ahora demuestran que existen numerosos subtipos de receptores GABA_A en el encéfalo. Las diferencias observadas al estimular farmacológicamente al receptor para GABA fueron los primeros indicios que sugirieron la existencia de subtipos.

El sitio del receptor GABA_A fue identificado por Olsen y colaboradores y otros²³, como un complejo receptor GABA-canal iónico con receptores para Picrotoxina (un agente bloqueador de canales de Cl⁻), barbitúricos y benzodiazepinas, además de GABA. El principal efecto que tiene el GABA al unirse a su sitio del receptor es inhibitorio.

En 1987, Schofield y colaboradores¹⁸ reportaron la identificación y secuencias de DNAc para las subunidades α y β del receptor GABA_A. Parece que estos dos polipéptidos fueron necesarios y suficientes para explicar toda la actividad biológica del

receptor GABA_A, incluyendo la modulación de la actividad del canal de cloro por barbitúricos y benzodiazepinas, Picrotoxina y Bicuculina, unión de radioligandos y curvas dosis respuesta a GABA con apropiada afinidad. Por otra parte, las secuencias observadas confirman la relación de éste con los receptores para acetilcolina-nicotínicos, la cual era esperada desde que se hicieron observaciones similares en estudios electrofisiológicos.¹⁸

Los receptores GABA_A de cerebros de mamíferos (bovinos) fueron purificados por cromatografía de afinidad a la benzodiazepina y, posteriormente, se encontraron 2 bandas en gel de electroforesis-SDS, la subunidad α (53 kDa) y subunidad β (56 kDa). El peso molecular nativo (en detergente) fue estimado entre 220 y 355 kDa y la composición de la subunidad sugiere ser $\alpha_2\beta_2$. El mayor sitio de unión de GABA fue identificado por autoradiografía (fotomarcaje) con [³H]-Muscimol, como la subunidad β de 56 a 58 kDa. La subunidad α puede marcarse intensamente mediante una reacción de fotoafinidad con el ligando fotosensitivo benzodiazepínico [³H]-flunitrazepam, lo que indica que el punto de unión de la benzodiazepina reside, al menos parcialmente, en la subunidad α .

Todas las subunidades del receptor para GABA cuando son expresados en células heterólogas producen actividad del canal cloro-GABA y los diferentes subtipos expresan diferentes propiedades farmacológicas. La distribución de mRNAs para los diferentes polipéptidos del receptor GABA_A y sus subtipos muestra significativa variación regional en el cerebro, consistente con las evidencias farmacológicas y bioquímicas para la heterogeneidad del receptor. Subpoblaciones de receptores GABA_A con diferentes locaciones celulares y regionales muestran diferente sensibilidad al GABA, a los moduladores esteroideos, a la regulación fisiológica, a los procesos de enfermedad y a la manipulación farmacológica por drogas como la benzodiazepina.

Una alternativa que puede ser útil para determinar la composición de los subtipos de las subunidades del receptor GABA_A son los anticuerpos subtipo-específicos. También han sido usados anticuerpos para sintetizar péptidos basados en la secuenciación de la clona del sitio activo, para identificar la subunidad en Western blots, para localizar en secciones del cerebro la presencia de subtipos de subunidades y para analizar la composición de las subunidades por inmunoprecipitación y cromatografía de

inmunofinidad.

Así, una o dos docenas de isoformas oligoméricas del receptor GABA_A tentativamente han sido identificados en el SNC. Algunas isoformas del receptor GABA_A coexisten en un solo tipo de neurona.

La combinación de los subtipos es comúnmente responsable de dar las propiedades farmacológicas. Por ejemplo, la sensibilidad de benzodiazepinas es conferida por la presencia del subtipo γ_2 . Las variaciones en la combinación de subtipos α con subtipos β y γ , sugieren diferencias en los efectos farmacológicos de la benzodiazepina, en las interacciones GABA[⋄]-benzodiazepina y en la modulación esteroide de la respuesta al GABA, pero no a los barbituratos y la picrotoxina o en la sensibilidad a la bicuculina.

La complejidad de la farmacología del receptor GABA_A esta incrementada por la heterogeneidad de las subunidades β y γ , la naturaleza de las cuales puede afectar la especificidad farmacológica. La naturaleza de la subunidad β afecta las propiedades del canal y la eficacia de las benzodiazepinas. La naturaleza de la subunidad γ afecta el sitio de unión de las benzodiazepinas.

Los polipéptidos del receptor para GABA tienen secuencias en común con los receptores acetilcolínicos y el de glicina. Asombrosamente, mas del 10% de los residuos de aminoácidos del receptor para GABA están posicionados idénticamente en varios dominios enormemente conservados en poco más de 20 DNAC que han sido obtenidos del nAChR conocido y de un DNAC del receptor para glicina que ha sido secuenciado.

Los 220 residuos de NH₂-terminal extracelular tiene considerable secuencia de identidad, incluyendo dominios de aproximadamente una identidad completa. Por ejemplo, posiciones 96-161 tienen 25/68 residuos idénticos entre los polipéptidos incluyendo el puente de cisteinas en las posiciones 138-152, el cual esta ampliamente conservado.

[⋄] Receptor de GABA

La siguiente figura es un diagrama de Venn que describe el número de aminoácidos idénticos entre los clones publicados de los polipéptidos (α_1 , α_2 y α_4 ; β_1 , β_2 y β_3 , γ_2 y δ) del receptor GABA_A para la rata. La subunidad α y γ están más relacionadas que α y β , α y δ , β y δ y más relacionados que β y α , β y γ o γ y δ .

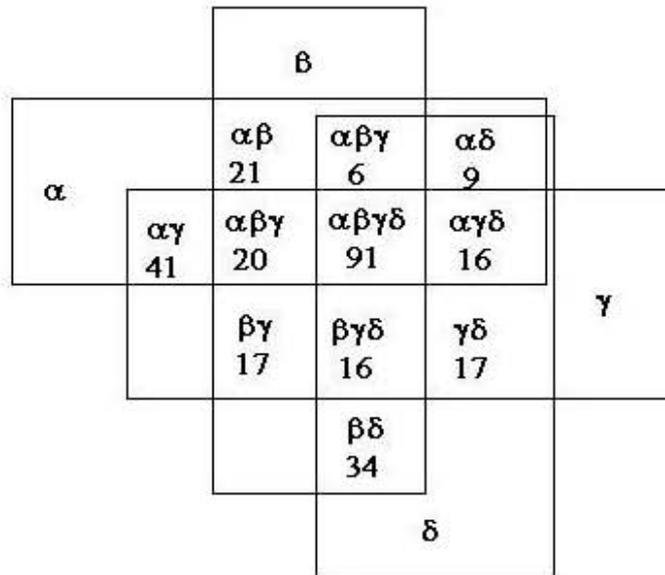
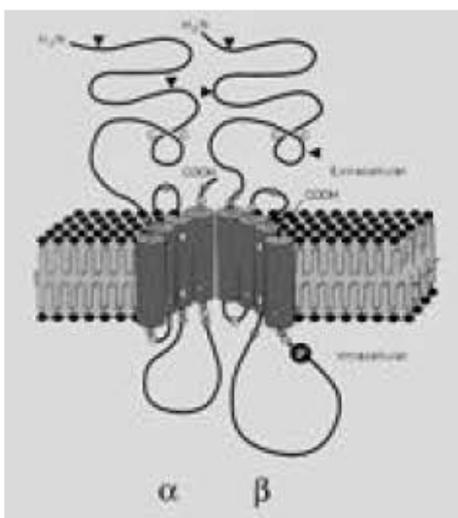


Diagrama De Venn

(Tomado de Olsen Richard W., Tobin Allan J., *Molecular biology of GABA_A receptors*. FASEB J. 4, March 1990, 1469-1478.)

La siguiente figura es un modelo de la estructura del canal del receptor hetero-oligomérico GABA_A, basado enormemente en los estudios del receptor para acetilcolina, otro miembro de la superfamilia de receptores ligando-canal iónico.



Estructura del receptor GABA_A

(Tomado de Macdonald Roberty I., Olsen Richard W., *GABA_A Receptor channels*. Ann. Rev. Neurosci. 17, 569-602, 1994)

Cada oligomero contiene al menos una copia de una subunidad α y β . El tipo α

es bastante abundante. Existen varios subtipos de β ; el tipo γ parece que provee propiedades esenciales a los oligómeros. El subtipo γ_2 es abundante y su localización en la rata se superpone considerablemente con las subunidades α_1 y β_2 .

La composición de las isoformas nativas ha sido deducida por la combinación de polipéptidos que están presentes en una célula. Algunos de ellos pueden ser aislados juntos, como un oligómero usando anticuerpos de subunidades específicas y sus propiedades farmacológicas puedan ser reconstituidas de subunidades recombinantes de combinaciones conocidas.

Los estudios muestran que la naturaleza de las subunidades α y β determina la especificidad farmacológica de los sitios de unión para GABA y las benzodiazepinas y que las subunidades γ son necesarias para la sensibilidad de las benzodiazepinas y la insensibilidad a la inhibición de Zn^{2+} .¹¹

Niveles de conductancia. El canal del receptor $GABA_A$ se abre por varios niveles de conductancia. Aunque la apertura del canal se da a varios niveles de conductancia, el principal nivel de conductancia es responsable de más del 95% de corriente a través del canal. La base para los múltiples niveles de conductancia es no conocida, pero los múltiples niveles pueden afectar la configuración o combinación de diferentes subunidades del receptor o la distribución de carga fuera del canal iónico. La duración de apertura incrementa con el aumento de concentración de GABA debido al cambio en el tipo de aperturas. A bajas concentraciones de GABA una breve apertura es registrada. A altas concentraciones de GABA, la apertura de dos estados de apertura más largos son más frecuentes. Las propiedades de apertura del receptor $GABA_A$ -canal iónico varían con la combinación de subtipos de subunidades.

El receptor $GABA_A$ media un incremento en la conductancia de la membrana con un potencial de equilibrio cerca de -70 mV. Este incremento de la conductancia a menudo está acompañado por una hiperpolarización de la membrana, resultando en un incremento en el umbral y consecuentemente, una reducción en la probabilidad de iniciación del potencial de acción, causando inhibición neuronal.

Modificación del receptor $GABA_A$ neuronal por fosforilación.

La función del receptor GABA_A tal vez sea modificado por tratamiento con agentes que incrementan la fosforilación. (Aunque no ha sido demostrado que el receptor de GABA_A pueda ser fosforilado *in vivo*). La proteína del receptor GABA_A puede ser fosforilado *in vitro* por PKC purificada y PKA, pero no por calmodulina dependiente de proteína-cinasa. Se ha demostrado que las subunidades β son fosforiladas *in vitro* por la PKA y la PKC.

El mecanismo de acción de los agonistas de benzodiazepinas es la transmisión GABAérgica, incrementando la frecuencia de apertura del canal en respuesta al GABA; las “no-benzodiazepinas” como β-carolinas, ciclopirrolonas e imidazopiridinas también se unen al sitio de benzodiazepinas. Las benzodiazepinas usadas para acciones ansiolíticas, relajadores musculares, sedantes y antiepilépticas, incrementan la probabilidad de apertura del canal en respuesta a GABA.

Los barbitúricos, en concentraciones farmacológicas, incrementan alostéricamente la unión de benzodiazepinas y GABA a sus respectivos sitios de unión. Los barbitúricos actúan incrementando la porción de canal abierto en más largo tiempo, incrementando el flujo de Cl⁻.

Los bloqueadores de canales, como el componente convulsivante picrotoxina, causan un decremento en el tiempo de apertura del canal. Convulsivantes experimentales como Pentilenetetrazol y el convulsante t-butilbiclofosforotionato (TBPS) actúan en una manera similar a la picrotoxina, bloqueando la permeabilidad del canal de Cl⁻.

1.4.3 RECEPTOR GABA_B.

La evidencia sobre la existencia de más de un receptor para GABA fue reportada en 1970 por DeGroat²³, quien demostró que GABA tal vez genera respuestas electrofisiológicas en ganglios simpáticos, por lo cual difiere de los llamados “receptores clásicos” (GABA_A) en el SNC. En 1979, Bowery y colaboradores²³ describieron los efectos de agentes depolarizantes en la emanación de GABA de células gliales simpáticas, y en 1981 este grupo identificó la presencia de receptores para GABA insensibles a la bicuculina (GABA_B) en terminales nerviosas periféricas autonómicas.

El receptor GABA_B es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G. Actúa tanto en las vías bioquímicas como en la regulación de canales iónicos de Ca²⁺ y K⁺ y tiene siempre una actividad inhibitoria. Estos receptores fueron identificados por su insensibilidad al antagonista de GABA_A (bicuculina) y a ciertos agonistas GABA_A-específicos.

Los efectos inhibitorios después de la activación del receptor GABA_B han sido reportados en varias áreas del cerebro y realzan su LTP (potenciación a largo plazo), el cual también puede ser inducido por el baclofeno, que es un agonista de GABA_BR. En 1991, Mott y Lewis²³ sugieren que la modulación del receptor GABA_B de plasticidad sináptica tal vez ocurra con una frecuencia estimuladora eléctrica en el rango del ritmo theta hipocampal, endógeno que ha sido mostrado que modula los LTP *in vivo*. Estos descubrimientos con los efectos inhibitorios del agonista del receptor GABA_B (baclofeno) en la corteza cerebral, han sugerido a Mott y Lewis que los receptores GABA_B tal vez son importantes reguladores de la plasticidad sináptica en muchas regiones del cerebro.

El receptor GABA_B es independiente de los canales de cloro, extramembranales y parece estar negativamente acoplado al sistema adenilato ciclasa y funciona a través de un mecanismo de proteínas G. También está acoplado indirectamente a canales de K⁺. Estos receptores están localizados en las terminales presinápticas y postsinápticas y controlan la liberación de GABA y otros neurotransmisores en el SNC, como por ejemplo dopamina y noradrenalina. En los mamíferos, los sitios GABA_B se pueden encontrar tanto fuera como dentro del cerebro y, no sorpresivamente, están presentes en pocas especies.

La activación de los receptores GABA_B (por ejemplo, por el baclofeno) conlleva una reducción de la liberación de neurotransmisores (dopamina, NA), efecto que no es producido por la isoguvacina y que solo aparece débilmente por la acción del muscimol. Puesto que estas respuestas no son bloqueadas por la bicuculina u otros antagonistas del GABA_AR, parecen ser debidos exclusivamente a los receptores de GABA_B. Los estudios de unión de ligandos que utilizan [³H]-GABA para marcar los receptores GABA_B han demostrado que las concentraciones fisiológicas de Ca²⁺ o Mg²⁺ son precisas para favorecer la unión a los receptores GABA_B y mientras que el GTP y GDP disminuyen la unión saturable de [³H]-baclofeno o [³H]-GABA al subtipo de receptores GABA_B, no

influyen en la unión a receptores GABA_A, lo que indica una unión entre los receptores GABA_B y la AC a través de las proteínas que se unen al nucleótido de guanina. Estas proteínas de membrana posibilitan las interacciones de muchos neurotransmisores con sus receptores y de las hormonas con sus respectivos receptores y la adenilato ciclasa. En el caso de los receptores de GABA_B, existe una inhibición de la actividad de la adenilatociclasa que, normalmente ocasionaría una disminución del nivel de AMPc en el interior de las terminales nerviosas que poseen estos receptores. A su vez, esto podría ocasionar un cambio en el estado de fosforilación de proteínas específicas, algunas de las cuales pueden estar relacionadas con los mecanismos de liberación de neurotransmisores. Este es un posible mecanismo por el que los receptores del GABA_B podrían controlar (disminuir) la liberación de GABA. Así pues, el tipo GABA_B está unido indirectamente a los canales de Ca²⁺. Los receptores GABA_B situados presinápticamente podrían controlar la liberación del neurotransmisor, influyendo directamente en la entrada de Ca²⁺ durante la despolarización de la terminal nerviosa.

Fuera de los más grandes centros del cerebro de mamíferos, un incremento en la conductancia del canal de K⁺ parece ser la primera respuesta neuronal de activación del GABA_BR y produce hiperpolarización de membrana. Esta respuesta ha sido descrita en numerosas regiones del cerebro, incluyendo la corteza cerebral del hipocampo, tálamo, septo y médula. Se ha reportado que el canal de K⁺ postsináptico modulado por baclofeno en neuronas hipocámpales es afectado por numerosas sustancias por ejemplo el anestésico local QX-314.

Estudios electrofisiológicos sobre los mecanismos pre y postsinápticos del GABA_BR sugieren que los receptores en estos sitios tal vez sean diferentes. Los estudios neuroquímicos no han ayudado hasta ahora a establecer una distinción entre receptores pre y postsinápticos.

Los receptores GABA_B pueden mediar ambas inhibiciones: postsináptica y presináptica. La inhibición presináptica puede ocurrir como un resultado de la estimulación de los receptores GABA_B en las terminales nerviosas, causando un decremento en el flujo de Ca²⁺ y reduciendo la liberación de los neurotransmisores. Los receptores GABA_B también han sido encontrados fuera del SNC, en tejidos donde no se tienen evidencias de que el GABA pueda ser producido, aunque trabajos de diferentes autores han mostrado que pequeñas cantidades del GABA se pueden encontrar en la

sangre circulante y, consiguientemente, estar repartidas por todo el cuerpo.

1.4.4 RECEPTOR GABA_C.

Recientemente, un nuevo receptor ionotrófico que está compuesto de subunidades ρ ha sido identificad primariamente, si no exclusivamente en la retina de vertebrados. Estos receptores para GABA, insensibles a bicuculina y baclofeno son frecuentemente llamados GABA_C²⁴.

Recientes estudios por Johnston y colaboradores indican que parcialmente el análogo de GABA el ácido *cis*-4-aminocrotónico (CACA) activa selectivamente a una tercera clase de receptor para GABA en el SNC de los mamíferos²⁵. Este receptor, el cual fue tentativamente designado GABA_C en 1984 por Drew y colaboradores, son poros de Cl⁻ que son insensibles a bicuculina y baclofeno. Recientemente ha sido posible estudiar este nuevo receptor para GABA a un nivel molecular, en subpoblaciones claramente definidas de neuronas retínales. Algunas líneas de evidencia indican que los receptores GABA_C están compuestos de subunidades ρ que expresadas heterológicamente, forman canales homooligoméricos con la característica farmacológica del receptor GABA_C. En la retina de los mamíferos, subunidades ρ y la respuesta de GABA_C están colocalizados en células bipolares y son espacial y funcionalmente distintas del receptor GABA_A o del receptor para glicina²⁴.

Una característica marcable y fisiológicamente significativa de los receptores GABA_C es su muy débil desensibilización aún en concentraciones muy altas de agonistas. Los receptores GABA_C muestran una muy baja y simple conductancia del canal pero un mejor y mayor tiempo de apertura²⁴.

Los efectos del receptor GABA_C han sido observados en el cerebelo, en la espina dorsal y en otras regiones del cerebro; la importancia funcional del receptor GABA_C fuera de la retina ha sido establecida. Este nuevo receptor tal vez representa relativamente una forma simple de canal iónico de apertura por ligando, el cual está formado de subunidades oligoméricas, en contraste con el receptor GABA_A heterooligomérico. Tal vez el tan complejo receptor GABA_A se ha desarrollado del simple receptor GABA_C.

Los receptores GABA_C parecen ser relativamente un simple canal de apertura por

ligando para Cl⁻, no son bloqueados por bicuculina y no son modulados por barbituratos, benzodiazepinas o esteroides neuroactivos; es insensible a fármacos que modulan a los receptores GABA_A y GABA_B y son activados selectivamente por el ácido cis-4-aminocrotónico (CACA).

Los receptores GABA_C pueden ensamblarse como oligómeros, con tres diferentes subunidades ρ (ρ_1 – ρ_3) que han sido clonadas de varias especies de mamíferos y vertebrados. Las subunidades ρ comparten solo 30-38% de la secuencia de aminoácidos con las subunidades del receptor GABA_A. Las subunidades proteicas ρ consisten en cuatro dominios transmembranales (TMs) con un bucle citoplasmático entre TM3 y TM4²⁵.

En 1991, Cutting y colaboradores clonaron la subunidad ρ_1 del DNAC humano²⁵. Este fue el primer miembro de una nueva familia de subunidades del receptor GABA y es expresado en niveles altos en la retina; una porción de las subunidades ρ_1 y ρ_2 muestran 74% de secuencia de aminoácidos idénticos.

La contraparte de las subunidades ρ humanas han sido clonadas parcialmente en ratas, revelando un 88-99% de similitud con la secuencia humana respectiva a nivel de proteínas. Usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación *in situ* se ha demostrado una alta expresión de ambas subunidades ρ en las células bipolares, manteniendo la idea de que las subunidades ρ son parte del receptor GABA_C. Mientras que la subunidad ρ_1 parece estar restringida a la retina, la subunidad ρ_2 también es expresada significativamente en otras partes del SNC, más notablemente en el hipocampo y la corteza. Esto es concebible con los efectos observados previamente del receptor GABA_C en la espina dorsal, el tectum, cerebelo e hipocampo²⁵.

En los 90's existió un aumento en el interés por el receptor GABA_C. Estos receptores fueron satisfactoriamente caracterizados vía una formidable combinación de biología molecular, estudios farmacológicos y fisiológicos. El mayor avance fue hecho en estudios de los receptores GABA en la retina por Woodward y colaboradores quienes expresaron el RNAm de retina bovina en oocitos de *Xenopus*, mientras que Cutting y colaboradores clonaron cDNAs de retina de humanos y Fiegenspan y colaboradores y Qian y Dowling hicieron sus estudios en receptores GABA_C nativos en retina de rata y

pescado.

Los genes de las subunidades para el receptor GABA_C están diferencialmente localizados dentro del genoma. Los genes para las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$ están separados de estos grupos y se ubican juntos en el cromosoma 6 humano o en el cromosoma 4 murino²⁴.

El receptor GABA_C mediado por una corriente de Cl⁻ es reducido a través de la activación de glutamato metabotrópico o receptores 5-HT₂ y el sistema IP3²⁵.

La farmacología de este nuevo receptor tal vez produzca componentes terapéuticos productivos. Futuros estudios tal vez investiguen la localización celular de receptores GABA_C y realmente revele una mayor complejidad en términos de heterogeneidad y modulación de estos receptores.

1.4.5 CÉLULAS BLANCO PARA GABA FUERA DEL SNC.

En muchas regiones del cerebro, los receptores GABA_A y GABA_B coexisten juntos, pero en ciertas áreas cerebrales los receptores GABA_B predominan sobre los receptores GABA_A. Por ejemplo, en el núcleo interpeduncular, la densidad de sitios GABA_BR es alta, mientras que los sitios GABA_AR son extremadamente bajos. Fuera del hipocampo, los receptores GABA_B también se encuentran en sitios pre y postsinápticos; datos electrofisiológicos indican su presencia en ambos sitios¹⁹.

Fuera del cerebro, los receptores GABA_B han sido descritos en axones terminales y células ganglionares del sistema nervioso autónomo, en la trompa de Falopio, útero y células del músculo liso intestinal, en la corteza del riñón, en músculo de la vejiga urinaria y en células intersticiales testiculares.

El primer reporte de una acción periférica de GABA fue publicado en 1970 por DeGroat¹⁶. Este autor demostró que GABA tal vez induce respuestas electrofisiológicas en ganglios simpáticos, en una manera diferente a la clásica a través de receptores GABA en el SNC. Ambos efectos en los receptores GABA_A y GABA_B han sido demostrados en el ganglio cervical superior. Además, en los estudios con un agonista del receptor GABA_A (muscimol), los resultados sustentan la presencia de sitios

específicos en el ganglio cervical superior.

En el sistema parasimpático, la presencia de ambos receptores GABA_A y GABA_B está documentada. Estudios sobre la acción moduladora de agentes GABAérgicos en la liberación de Ach y en la respuesta contráctil de diferentes segmentos del tracto gastrointestinal, así como varios estudios electrofisiológicos, han proporcionado evidencia contundente sobre la presencia de receptores GABA_A y GABA_B en elementos neurales pre y postgangliónicos del plexo mesentérico. Estudios recientes con el antagonista selectivo de receptor GABA_B, baclofeno, confirman esta evidencia.

Respuestas similares contráctiles y de liberación de Ach después de la estimulación por GABA han sido reportadas para la vejiga urinaria y la vesícula que contiene la bilis en varios mamíferos, indicando que ambos receptores están localizados en terminales colinérgicas en ese órgano.

En otros experimentos se han demostrado la modulación GABAérgica de la liberación de Ach de secciones del pulmón de cobayo y, además, los efectos GABAérgicos específicos en contracciones colinérgicas del músculo liso, traqueal aislado del mismo animal indican que una población de receptores GABA inhibidores en terminales colinérgicas están localizados en los tejidos del aparato respiratorio.

Células endocrinas.

Experimentos con preparaciones de membrana de las células de médula adrenal, así como con células adrenales cromafines permitieron demostrar que la médula adrenal posee sitios GABA_AR y GABA_BR. El hallazgo de una respuesta adrenalina-secretoria como una consecuencia del estímulo con GABA exógeno sobre cultivos de células cromafines apoya la idea de que estas células tienen receptores GABA_A. Esta observación ha recibido un sustento recientemente por autoradiografía y en métodos bioquímicos *in vivo*. Los receptores GABA_B tal vez modulan el llamado acetilcolina-catecolamina. También se ha reportado la existencia de un receptor de GABA que modula la liberación encefálica de los péptidos contenidos en la médula adrenal.

En cultivos de células β pancreáticas se ha observado una respuesta moderada después de la adición de GABA, lo cual sugiere que un metabolismo, mejor que un

receptor, es lo que regula la función de las células β por GABA. Experimentos autoradiográficos sugieren que una subpoblación de células β que contienen somatostatina tal vez ejerce presión sobre receptores específico de GABA.

El sitio de unión de muscimol ($GABA_A$) ha sido encontrado en células granulosas en folículos de ovarios; GABA también modula la secreción andrógena en tejido testicular.

Células exocrinas.

La evidencia autoradiográfica disponible indica que sitios de receptor para GABA están presentes en células epiteliales de los ductos excretorios intralobulares del páncreas.

La presencia de receptores $GABA_B$ en el epitelio de los túbulos enrollados de la corteza renal de la rata también ha sido demostrada por autoradiografía.

Minuk y colaboradores¹⁶ demostraron, en una preparación de hepatocitos, que estas células eran sensibles a la bicuculina y, por lo tanto, debían tener sitios de unión de GABA en la membrana.

También existe evidencia autoradiográfica que sugiere la presencia del receptor $GABA_A$ en células de la mucosa gástrica.

Células de músculo liso.

Fujiward y colaboradores¹⁶ fueron los primeros en indicar que los receptores para el GABA están localizados en células del músculo liso y en arterias cerebrales de perro, lo cual ha sido sustentado recientemente por estudios autoradiográficos colocando los tejidos en presencia de diferentes niveles de muscimol.

Otros.

Dolci y colaboradores¹⁶ demostraron que, dependiendo de su concentración, GABA tal vez incrementa o disminuye la motilidad de los espermatozoides.

Los receptores GABA_A también han sido encontrados en los órganos reproductores femeninos, en los cuales existe un complejo ionoforo benzodiazepina-barbitúrico-canal de cloro, similar al receptor GABA_A en el SNC. Se sabe que las benzodiazepinas actúan en este complejo receptor, que interfiere con la cilogénesis en el oviducto por prevención de la migración de cuerpos basales de la superficie apical. GABA ha sido encontrado concentrado en cinetosomas del oviducto filial. Estos hallazgos indican un papel morfogénico de GABA en el oviducto.

1.4.6 RECEPTORES DE GABA MEDIAN LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS T.

Muchas de las células del sistema inmune expresan receptores para moléculas neuroactivas, creando una relación entre el sistema nervioso y el sistema inmune. GABA es un neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. Fuera del cerebro, receptores de GAD y GABA han sido demostrados en los islotes pancreáticos, el tracto gastrointestinal, los ovarios y la médula adrenal. Interesantemente, la administración de GABA o sus agonistas inhibe periféricamente la producción de anticuerpos y modula la fagocitosis de los macrófagos *in vivo*, lo cual sugiere que GABA participa en la regulación de algunas funciones del sistema inmune¹⁰.

Existen al menos dos tipos de receptores neuronales de GABA: GABA_A y GABA_B. Los receptores de GABA_A están en un canal de iones (Cl⁻). El muscimol que actúa como un agonista del receptor de GABA_A y las benzodiazepinas ansiolíticas, así como algunos agentes anestésicos (el pentobarbital, por ejemplo), potencian la apertura del canal para los iones Cl⁻. La bicuculina antagoniza las funciones del receptor de GABA_A y la picrotoxina bloquea el efecto de GABA sobre el canal para Cl⁻, de modo que resulta un antagonista del GABA_A. Los receptores de GABA_B se encuentran indirectamente asociados con canales iónicos para Ca²⁺ o K⁺, y son selectivamente activados por baclofeno. Los receptores de GABA_B son insensibles a bicuculina y picrotoxina. Los linfocitos T murinos expresan receptores funcionales de GABA¹⁰. GABA puede inhibir las respuestas de las células T a antígenos tanto *in vitro* como *in vivo*¹⁰.

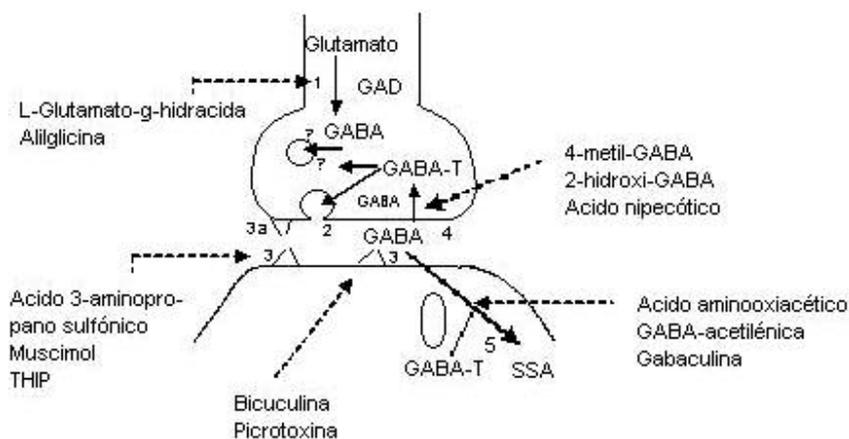
En un experimento realizado en la Universidad de California, los investigadores Tian y colaboradores encontraron que, en presencia de GABA, el anticuerpo anti-CD3 reduce significativamente la respuesta proliferativa de los linfocitos T¹⁰. GABA por sí

misma, sin anti-CD3, no estimuló ni inhibió la proliferación de los linfocitos T y tuvo un pequeño impacto en la sobrevivencia de esas células en el sistema experimental utilizado. Estos datos sugieren que los linfocitos T expresan de manera natural receptores de GABA y que GABA puede inhibir la proliferación de células T a través de un camino de señales TCR/CD3. También se ha encontrado¹⁰ que en presencia de GABA, la secreción de IL-2 se reduce de una manera dependiente a la dosis. El agonista muscimol también inhibió la proliferación de los linfocitos T estimulados por antígenos y por el anticuerpo anti-CD3, en una manera dependiente de la dosis. En contraste, el baclofeno tuvo un pequeño efecto en la proliferación de los linfocitos T y no interfirió con la acción inmunosupresora del muscimol. Esto indica que los receptores de GABA_A pero no los de GABA_B pueden intervenir en la inhibición de la respuesta de los linfocitos T. Estos datos farmacológicamente demuestran la presencia de receptores funcionales de GABA_A en los linfocitos T, los cuales median los efectos inmunosupresores del GABA. Además, estos receptores GABA_A de linfocitos pueden ser manipulados farmacológicamente en una manera similar a los receptores neuronales de GABA_A¹⁰. Análisis farmacológicos mostraron que el efecto inmunoinhibitorio de GABA podría ser imitado por agonistas de GABA_A pero no por agonistas de GABA_B. El efecto inhibitorio de GABA fue grandemente reducido por antagonistas competitivos del receptor GABA_A (bicuculina) y completamente anulado por un bloqueador de canal Cl⁻ (picrotoxina). Estos datos demuestran que los receptores funcionales de GABA_A en los linfocitos T son farmacológicamente similares a los de sistema nervioso central. Estos investigadores tienen evidencia de la expresión de la subunidad alpha del receptor GABA_A por RT-PCR.

1.5. Agonistas y Antagonistas de GABA.

1.5.1 FARMACOLOGÍA DE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS.

Los medicamentos pueden influir en la función GABAérgica al interactuar en muchos sitios diferentes tanto pre como postsinápticos. También pueden influir en eventos presinápticos y modificar la cantidad de GABA que, en última instancia, alcanza e interactúa con los receptores postsinápticos de GABA. Las acciones presinápticas de los medicamentos implican a los efectos inhibitorios ejercidos sobre las enzimas que intervienen en la síntesis de GABA (GAD), su degradación (GABA-T) y su recaptación neuronal. Recientemente se ha puesto particular énfasis al estudio de la interacción de medicamentos con los receptores de GABA. Los que interactúan a nivel de receptores de GABA pueden clasificarse en dos categorías generales, agonistas de GABA y antagonistas de GABA.



- Sitio 1. Síntesis enzimática
- Sitio 2. Liberación
- Sitio 3. Interacción con receptores postsinápticos
- Sitio 3a. Autorreceptores presinápticos
- Sitio 4. Recaptación
- Sitio 5. Metabolismo

Sitio de acción de medicamentos en la neurona GABAérgica.

(Tomado de Cooper Jack R., *Las bases bioquímicas de la neurofarmacología*. Ed. El Manual Moderno. 1977, pp.174-193)

1.5.2 AGONISTAS DE GABA.

Los estudios electrofisiológicos han demostrado que hay una gran diversidad de

compuestos que pueden activar directamente a los receptores de GABA que son sensibles a bicuculina. Estos agonistas pueden subdividirse fácilmente en dos grupos basándose en su capacidad para penetrar la barrera hematoencefálica, y, por tanto, tomando en cuenta si son o no activos después de su administración general. Agentes como el ácido 3-aminopropanosulfónico, el ácido β -guanidinopropiónico, el ácido 4-aminotetrólico, el ácido trans-4-aminocrotónico, y el ácido trans-3-aminociclopentano-1-carboxílico son eficaces al intervenir directamente como agonistas del GABA. Sin embargo es mínima la cantidad de estos agentes que llega al cerebro después de su administración general, por consiguiente se clasifican dentro de los que no pueden penetrar la barrera hematoencefálica fácilmente.

En el segundo grupo, que atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica y son activos después de su administración general tenemos al muscimol (3-hidroxi-5-aminometilisoxazol) que es uno de los agentes de este grupo que más ha sido estudiado. Es aislado de un hongo psicoactivo (alucinógeno) *Amanita muscaria*. Es un agonista potente y específico de GABA_A.

Otros agentes de este grupo incluyen (5)-(-)-5-(1-aminoetil)-3-isoxazol, el THIP (un análogo del muscimol bicíclico), el SL-76002 [a (cloro-4-fenil) fluoro-5-hidroxi-2-bencildenamino-4H-butiramida] y la amina kojic (2-aminometil-3-hidroxi-4H-pirano-4ona).

Agonista de GABA	Penetra Barrera Hematoencefálica
Ácido 3-aminopropanosulfónico	NO
Ácido β -guanidinopropiónico	NO
Ácido 4-aminotetrólico	NO
Ácido trans-4-aminocrotónico	NO
Ácido trans-3-aminociclopentano-1-carboxílico	NO
3-hidroxi-5-aminometilisoxazol (muscimol)	SI
(5)-(-)-5-(1-Aminoetil)-3-Isoxazol	SI
THIP Tetrahydroisoxazolopiridinol	SI
SI-76002 [a (cloro-4-fenil) fluoro-5-hidroxi-2-bencildenamino-4h-butiramida]	SI
2-aminometil-3-hidroxi-4H-pirano-4-pna (Amina Kojic)	SI

Clasificación de Agonistas de GABA

Además de la clasificación basada en su capacidad de penetrar la barrera

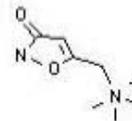
hematoencefálica, los agonistas GABAérgicos pueden subdividirse aun más en compuestos que estimulan directamente los receptores de GABA y aquellos que causan una activación indirecta de estos receptores por diferentes mecanismos. Los agentes como el muscimol, la isoguvacina y el THIP son verdaderos agente miméticos del GABA que interactúan directamente con sus receptores. Los que actúan indirectamente facilitan la transmisión GABAérgica al incrementar la cantidad de GABA endógeno que llega al receptor o alterando en alguna forma el acoplamiento del receptor de GABA ionoforo y su interacción para facilitar los cambios en los receptores de GABA mediados por la permeabilidad a los cloruros.

Medicamentos como la gabaculina (un inhibidor de la GABA-T), el ácido nipecótico (un inhibidor de la captación de GABA) y el baclofen (una sustancia que además de muchas otras acciones, causa la liberación del GABA de sus almacenes intracelulares), a menudo son clasificados incorrectamente como agonistas del GABA, cuando en realidad actúan presinápticamente y modifican la liberación de GABA y su metabolismo más que interactuar directamente con los receptores de GABA. Las benzodiazepinas también potencian la acción de la liberación tónica de GABA en los receptores por el desplazamiento de un inhibidor endógeno de la fijación en los receptores de GABA.

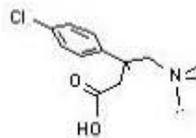
Muchos imitadores de GABA a receptores sensibles a bicuculina (Receptor GABA_A) fueron inactivos a sitios de GABA_B. El β-p-clorofenil-GABA o baclofeno han sido sintetizados o vendidos como agentes antiespásticos. El Baclofeno es un agonista de GABA en la espina dorsal pero es principalmente notable porque tiene una acción selectiva sobre los receptores GABA_B y deprime la liberación evocada del transmisor y la respuesta de contracción en una manera dosis-dependiente. Es virtualmente inactivo a sitios GABA_A pero es estereoespecíficamente activo a sitios GABA_B. El baclofeno (-) es la forma activa.

El agonista más potente hasta ahora descrito de GABA_B es el análogo fosfínico ácido 3-aminopropilfosfínico y su análogo metilado, pero aunque ellos exhiben 10-100 regiones de más alta afinidad para el sitio de unión al GABA_BR que baclofeno (-), esta afinidad no se mantiene en todos los ensayos funcionales.

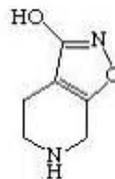
SO₃-H-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂
Acido 3-aminopropanosulfonico (3-APS)



Muscimol



Baclofeno



Tetrahydroisoxazolo[4,5-b]piridinol
(THIP)

Estructuras químicas de los Agonistas de GABA

1.5.3 ANTAGONISTAS DE GABA.

La acción del GABA en el complejo receptor-ionóforo puede ser antagonizada por los antagonistas del GABA, ya sea en forma directa por incompetencia con el GABA por su receptor, o bien, indirecta, por la modificación del receptor o por la inhibición del ionoforo activado de GABA.

Los dos antagonistas clásicos del GABA son: la bicuculina y la picrotoxina. Los dos actúan en los receptores postsinápticos solo que la bicuculina actúa como un antagonista competitivo directo del GABA a nivel del receptor, en tanto que la picrotoxina actúa como un antagonista no competitivo, quizá debido a que puede bloquear los ionoforos activados del GABAR. Ambas drogas son potentes convulsivantes y únicamente tienen un interés experimental, ya que no se administran a los pacientes.

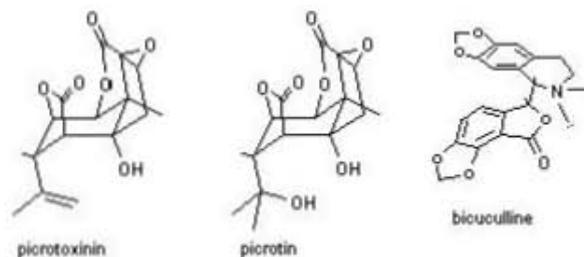
El clásico antagonista del receptor GABA_A es el convulsivante bicuculina, el cual reduce la frecuencia y el tiempo de apertura del canal. Es un alcaloide eftálico isoquinolina (C₂₀H₁₇O₆N) aislado a partir de una fumariácea holandesa, *Dicentra cucullaria*. Es un inhibidor más específico de la acción del GABA en el SNC de los mamíferos. Es inestable a 37°C y a pH fisiológico. Bajo condiciones fisiológicas normales, la bicuculina es hidrolizada a bicucina, un antagonista de GABA relativamente inactivo con una vida media corta de algunos minutos. Las sales cuaternarias que se

utilizan actualmente para la mayor parte de los experimentos electrofisiológicos (metilioduro de bicuculina y metacloruro de bicuculina) son mucho mas hidrosolubles y estables en un amplio rango de pH que oscila de 2-8. Sin embargo, estas sales cuaternarias no son adecuadas para administración general debido a su mala penetración al sistema nervioso central.

La picrotoxina (PTX) es una sustancia natural que se encuentra en las bayas de los arbustos *Anamirta cocculus*, en el este de la India. La droga esta en las semillas de la planta, llamada comúnmente “fish-averies” (“fruta para pescar”). Es un compuesto neutro, no nitrogenado que puede descomponerse en dos dilactonas, *Picrotoxinina* y *pirrotina*; esta última es inactiva. La picrotoxinina es el componente activo.

La PTX se une alostéricamente previniendo cambios conformacionales de la proteína del receptor. Es la mejor sustancia disponible para antagonizar las acciones de GABA. Es un poderoso estimulante y afecta todas las regiones del SNC. En los mamíferos se ha demostrado que la PTX bloquea la inhibición presináptica y la inhibición postsináptica resistente a la estrocinina en el SNC. Antagoniza selectivamente el GABA en todos los niveles del SNC, tal vez interaccionando con sitios íntimamente asociados con el ionóforo. Es una sustancia muy tóxica, se absorbe por todas las vías pero el efecto pleno sobre el SNC no se ve hasta que pasan algunos minutos; una dosis de 20 mg puede producir síntomas de envenenamiento severo. El diazepam es un antídoto efectivo para el envenenamiento por PTX. Antes era empleada en el tratamiento del envenenamiento por depresores del SNC, no es un estimulante respiratorio, ni se le considera como agente terapéutico útil. Otros antagonistas incluyen pitzazepin, amidina esteroide RU5135

Los fármacos de mayor utilidad para confirmar la mediación GABAérgica han sido bicuculina y PTX, sin embargo, muchos otros agentes farmacológicos inductores de convulsiones y cuyos efectos no se explicaban con anterioridad (entre ellos penicilina y feniltetrazol) pueden actuar también como antagonistas relativamente selectivos de la acción del GABA.



Estructuras químicas de los Antagonistas de GABA

1.5.4 MODIFICACIÓN DEL RECEPTOR GABA_A NEURONAL POR FARMACOS.

Se ha visto que un número de drogas modifican el receptor GABA_A. Barbitúricos y benzodiazepinas (BZP) potencializan la respuesta del receptor GABA_A, a través de diferentes sitios regulatorios alostéricos en el receptor GABA_A. Los esteroides, incluyendo anestésicos esteroideos y metabolitos de progesterona también potencializan la respuesta del receptor. Las drogas bicuculina, PTX, metil-6,7-dimetoxi-4-etil-β-carbolina-3-carboxilato (DMCM) y la penicilina reducen la inhibición mediada por GABA.

Se dice que hay un "mejoramiento" del receptor para GABA cuando una droga incrementa la conductancia y/o la frecuencia de duración de la apertura del canal.

Los barbitúricos mejoran la afinidad de unión a sitios de afinidad baja e intermedia e imitan a GABA por la apertura del canal, en ausencia de GABA. Los barbitúricos activos alostéricamente inhiben la unión *in vitro* de PTX. Sedantes-hipnóticos, anestésicos y barbitúricos anticonvulsantes así como no-barbitúricos relacionados como etazolato, etomidol y LY81067 mejoran la medida de GABA_A por métodos electrofisiológicos o radioseñales de flujo iónico. Resultados de análisis de fluctuación sugieren que el fenobarbital y el pentobarbital incrementan la duración de apertura del receptor GABA_A, sin alteración de la conductancia.

Las drogas activas en el sitio de PTX incluyen productos naturales y experimentales, convulsantes policíclicos, sintéticos como el pentilenetetrazol y compuestos biciclofosfato como el TBPS. Todos estos compuesto inhiben competitivamente radioniveles de PTX o TBPS, uniéndose y bloqueando la actividad del canal del receptor GABA_A por GABA, en la misma manera que PTX.

Las BZP usadas clínicamente como ansiolíticos, antiepilépticos, relajantes musculares y actividad hipnótica, mejoran el receptor GABA_A. El diazepam mejora el receptor GABA_A, por un incremento en la frecuencia de apertura, sin alteración de la conductancia del canal o duración de apertura. Los BZP refuerzan la inhibición presináptica segmentaria mediada por el GABA e imitan la acción inhibitoria presináptica del GABA sobre las terminales nerviosas preganglionares. Estos fármacos muestran también una acción antagonista sobre los mecanismos GABAérgicos postsinápticos. En general, las benzodiazepinas actúan de forma similar al GABA sobre todos los mecanismos inhibitorios conocidos que se deben a la acción fisiológica del GABA, aunque a través de cierta acción potenciadora directa, en lugar de un antagonismo GABAérgico directo. *In vitro*, las concentraciones micromolares de las BZP incrementan la afinidad del GABA por los receptores GABAérgicos situados sobre las membranas sinápticas de GABA.

Los esteroides femeninos, como la hormona sexual progesterona, tienen actividad sedativa. Estos compuestos mejoran la función del receptor GABA_A y la unión de una manera que asemeja los barbitúricos.

Los efectos sinérgicos de los esteroides y los barbitúricos indican que ellos tienen distintos sitios de acción en el complejo del receptor GABA_A. La conductancia del receptor es inalterada por esteroides.

El antibiótico penicilina G inhibe el receptor GABA_A, inhibe la unión de PTX, pero solo en altas concentraciones.

1.5.5 FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR GABA_B.

La bicuculina, y la PTX no tienen efectos en el receptor GABA_B. El flaclofeno, un derivado fosfónico del baclofeno fue el primer antagonista selectivo del receptor GABA_B; la afinidad de este por los sitios de unión de GABA_B en las membranas sinápticas del cerebro de rata es un exceso de 100 μM. Datos obtenidos con flaclofeno proveen la primera evidencia de su papel fisiológico para receptores GABA_B en el cerebro de mamíferos.

El más reciente antagonista es el CPG 36742, el cual puede bloquear los efectos de baclofeno mientras no se producen efectos en ausencia de agonistas exógenos

Tal vez el antagonista más excitante reportado hasta ahora ha sido el estudiado por Froestly y colaboradores¹⁹. Estos autores han descrito recientemente resultados obtenidos con agonistas de GABA_B, con afinidad nanomolar por el receptor. Por sustitución con un monocloro en el nitrógeno del antagonista CGP 36742, la afinidad por la unión al GABA_BR se incrementa de 35μM a 1 μM y 55 nM, respectivamente. Además la sustitución en el carbono β con grupos metilo o hidroxilo incrementa la afinidad. Estas observaciones contrastan a las obtenidas con agonistas donde la sustitución en el nitrógeno disminuye la actividad del receptor GABA_B en todos los casos.

1.5.6 FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR GABA_C.

Los receptores GABA_C son un grupo distinto farmacológicamente. El receptor GABA_C no responde a bicuculina y baclofeno. Los diferentes perfiles farmacológicos del receptor GABA_A y GABA_C se muestran en la siguiente tabla:

Diferencia farmacológica de los receptores GABA_C y GABA_A

Ligando	Receptor GABA _C	Receptor GABA _A
Bicuculina	Inactivo	Antagonista
Baclofeno	Inactivo	Inactivo
Picrotoxina	Antagonista ^a	Antagonista
TACA	Agonista	Agonista
CACA	Agonista	Inactivo
TAMP	Agonista	Agonista débil
CAMP	Agonista	Inactivo
Muscimol	Agonista parcial	Agonista
Isoguvacina	Antagonista débil	Agonista
THIP	Antagonista débil	Agonista
I4AA	Antagonista	Agonista
TPMPA	Antagonista	Inactivo
1, 4-Benzodiazepinas	Inactivo	Moduladores ^b
Barbituratos	Inactivo	Moduladores
Neuroesteroides	Inactivo	Moduladores

^aFuerte antagonista solo para el receptor homooligomérico ρ1

^bNo activo a subtipos de receptores GABA_A α4βγ, α6βδ y αβε GABA_A

Abreviaciones: CACA, ácido cis-4-aminocrotonico; CAMP, ácido cis-2-aminometil-ciclopropano carboxílico; I4AA, ácido imidazol-4-acético; THIP, 4, 5, 6, 7-tetrahidroisoxazolo [5, 4-c] piridin-3-ol; TPMPA ácido (1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina-4-ol) metilfosfínico.

Tomado de Bormann J. *The "ABC" of GABA receptors*. Pharmacol Sci, 21 : 16-19, 2000.

Notablemente, CACA es un agonista selectivo para los receptores GABA_C, pero inactivo a receptores GABA_A, considerando que el enantiómero *trans* TACA no muestra igual preferencia. Además, TPMPA [ácido (1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina-4-ol) metilfosfinico) ha sido identificado como un agonista potente y enormemente selectivo para receptores GABA_C. El receptor GABA_C es insensible a fármacos moduladores para GABA_A como benzodiazepinas, barbituratos y neuroesteroides.

1.5.7 AGONISTAS DEL RECEPTOR GABA_C.

Diferencias en el perfil de unión de los agonistas de los receptores GABA_A y GABA_C han sido reveladas por usos de análogos de GABA de conformación restringida. La más pronunciada diferencia fue observada para TACA y su enantiómero *cis* CACA.

El compuesto CACA activa preferentemente al receptor GABA_C; es mucho más selectivo a este receptor que el agonista más potente (TACA) el cual interactúa fuertemente con una variedad de macromoléculas que reconocen al GABA.



ácido 4-aminocrotónico

Propiedades de los receptores GABA_A, GABA_B y GABA_C.

Característica	GABA _A	GABA _B	GABA _C
Mecanismo del receptor	Ionotrópico (canal de Cl ⁻)	Metabotrópico (acoplado a proteína G)	Ionotrópico (canal de Cl ⁻)
Subunidades proteínicas	α ₁₋₆ , β ₁₋₃ , γ ₁₋₃ , δ	No conocidas	ρ ₁ , ρ ₂
<i>Farmacología</i>			
GABA	+	+	++
Muscimol	++	Inactivo	+/-
THIP P4S	++	Inactivo	Competitivo-
TACA	++	Inactivo	++
CACA	¿Inactivo?	Inactivo	+/-
3-APMPA, 3-APPA	Inactivo	++	Competitivo-
3-APA	Inactivo	+/-	Competitivo-
Baclofeno	Inactivo	+	Inactivo
Saclofeno, Faclofeno	Inactivo	Competitivo-	Inactivo
Bicuculina	Competitivo-	Inactivo	Inactivo
Picrotoxina	No competitivo-	Inactivo	No competitivo-

+ Agonista; ++ Potente agonista; - Antagonista; -- Potente antagonista; +/- Parcial agonista

Tomado de Manocha A. *Pharmacology of GABA_C receptors*. Indian Journal of Pharmacology, 30 : 218-226, 1998.

En general TACA, el isómero *trans* de CACA, es el agonista más potente. Los receptores GABA_C son activados por CAMP, el *cis* enantiómero del ácido carboxílico 2-aminometilciclopropano (CAMP), el cual es un análogo de GABA, pero este compuesto es inerte a receptores GABA_A. Estos hallazgos confirman la sugerencia original de Johnston y sus colegas que los análogos de GABA tal vez sean agonistas selectivos al receptor GABA_C²⁵.

1.5.8 ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR GABA_C.

Los antagonistas competitivos más potentes de la respuesta de GABA_C son: 3-APMPA [ácido 3-aminopropil (metil) fosfínico], 3-APPA (ácido 3-aminopropilfosfínico) y 3-APA (ácido 3-aminopropilfosfónico).

Ligandos selectos que actúan en el receptor GABA_C

Agonistas GABA _C	Antagonistas GABA _C	Bloqueadores del canal de Cl ⁻
Muscimol ^d	Isoguvacina	Picrotoxina
TACA	THIP	TBPS
CACA ^a	P4S	γHCH
TAMP ^a	Ácido Isonipeecótico	
CAMP	3-APS	
GABA	ZAPA	
	I4AA ^a	
	SR95531	
	3-APMPA	
	3-APPA	
	3-APA	
	DAVA	

^a Parcial agonista

Tomado de Manocha A. *Pharmacology of GABA_C receptors*. Indian Journal of Pharmacology, 30 : 218-226, 1998.

3-APMPA y 3-APPA también son potentes agonistas del receptor GABA_B, mientras que el 3-APA es un agonista parcial del receptor GABA_B.

El ácido δ-aminovalérico es también un moderado antagonista del receptor GABA_C. Ni el agonista baclofeno o el antagonista faclofeno del receptor GABA_B influyen sobre el receptor GABA_C.

Los análogos de GABA, isoguvacina, 4, 5, 8, 7-tetrahidroisoxazol [5, 4, -c] piridin-

3-ol (THIP), el ácido piridin-4-sulfónico (P4S) muestran débil efectos antagonistas del receptor GABA_C o no muestran efecto alguno.

El análogo de GABA ácido acético-4-imidazol es un fuerte antagonista del receptor GABA_C.

El antagonista competitivo del receptor GABA_A, bicuculina, es 5000 veces menos potente en GABA_C que en GABA_A.

La PTX ha sido reportada que bloquea algunos receptores GABA_C bajo ciertas condiciones. Shimada y colaboradores encontraron que la PTX y el inhibidor del canal de Cl⁻ TBPS (t-butilbiciclofosforotionato) bloquean canales de GABA_C activados, en oocitos inyectados en el RNAm humano para la subunidad ρ_1 ²⁵.

1.6. Aplicaciones de GABA.

No se han obtenido hasta ahora efectos terapéuticos útiles con el uso de compuestos que imitan la acción del GABA (como muscimol), inhiben su recaptación activa (como la de 2,4-diaminobutirato, ácido nipecótico y guvacina) o alteran su recambio (como ácido aminooxiacético).⁸ Sin embargo, en los últimos años han proliferado avisos en Internet sobre el uso empírico del GABA y sus agonistas con diferentes propósitos, desde quitar arrugas, hasta antiepiléptico, desestresante, anti-envejecimiento, para bajar de peso, para estabilizar la presión sanguínea, para la depresión y para facilitar el sueño entre otros.

La manipulación farmacológica de la transmisión GABAérgica es una efectiva aproximación para el tratamiento de la ansiedad. Además, ha sido demostrado su acción depresora en el sistema nervioso por barbitúricos y otros anestésicos generales, resultado de la transmisión sináptica inhibitoria, mediada por los receptores de GABA_A.

No hay agonistas de GABA en uso clínico en la actualidad; sin embargo, existe interés en el desarrollo de nuevas drogas con este tipo de acción, porque ellas bien podrían tener una aplicación en el tratamiento de la epilepsia y en el control de desórdenes del movimiento.

Sin embargo, existen numerosas drogas que modifican la respuesta neuronal de GABA, no actuando directamente en los receptores de GABA, al contrario de las benzodiazepinas y los barbitúricos, que facilitan el paso del cloro a través del receptor para GABA, potencializando así su respuesta.

No se ha descubierto ningún medicamento para bloquear eficazmente la captación del GABA en el tejido nervioso sin ejercer muchas otras acciones farmacológicas indeseables. La elaboración de un inhibidor selectivo de la captación de GABA sería muy útil para los estudios de este aminoácido en el SNC.

El dipropilacetato sódico (epilim, roquentin) es utilizado ampliamente como un anticonvulsante clínico, eficiente. Los niveles del GABA-T constituyen, en general, una

fuerza valiosa para la síntesis de fármacos anticonvulsantes. Los inhibidores de la transaminasa tienen efectos relajantes y anticonvulsivos; el acetato de dipropilo (valproato) se utiliza ampliamente como antiepileptico.

Debido a que la GAD y la GABA-T dependen de la coenzima fosfato de piridoxal, no es sorprendente que los agentes farmacológicos o las condiciones anormales que afectan a esta coenzima puedan provocar alteraciones en el contenido del GABA en el cerebro. Pueden provocar convulsiones epiléptiformes por la falta de esta coenzima o por su inactivación. Condiciones de esta clase conducen también a la reducción de GABA, ya que la GAD parece que se inhibe de preferencia sobre la transaminasa, quizá debido al hecho de que la GAD tiene una afinidad menor para la coenzima que la que tiene la GABA-T. El ácido aminooxiacético es un inhibidor de fosfato de piridoxal, también inhibe GABA-T y es un anticonvulsante.

En los lactantes, una alimentación deficiente en vitamina B₆ puede conducir a la producción de convulsiones que responden bien al tratamiento con piridoxina.

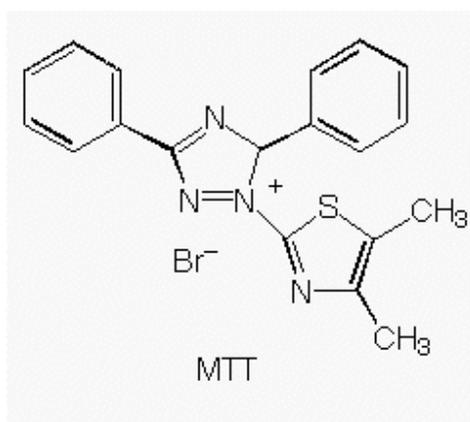
Los agonistas de GABA_B tal vez son útiles drogas antiasmáticas, ya que la activación del receptor GABA_B dentro de los bronquios disminuye la liberación de acetilcolina y sustancia P, los cuales normalmente incrementan la resistencia en los conductos de ventilación y también disminuyen la hiperactividad bronquial, la cual es una característica del asma. También disminuyen la motilidad intestinal y su propiedad tal vez sea una importante indicación para su uso en estados sobreactivados, sin los efectos asociados, por ejemplo con el antagonismo del receptor muscarínico para ACh.

Los receptores GABA_B parecen ser de mayor importancia en procesos sinápticos fuera del cerebro y están presentes en ambos sitios: pre y postsinápticos. Su activación puede hiperpolarizar neuronas y disminuir la liberación de neurotransmisores en terminales presinápticas. Drogas como el Baclofeno, que imitan esta activación, son usadas terapéuticamente¹⁹. Drogas que interfieren con la activación del receptor GABA_B deben también ser agentes terapéuticos importantes.

1.7. Sal de Tetrazolio: MTT

Idealmente, un ensayo colorimétrico para células vivas debe utilizar un sustrato colorido que sea modificado a un producto colorido (diferente al primero) solo por las células vivas pero no por células muertas o tejidos en medio de cultivo. Las sales de tetrazolio son atractivos candidatos para este propósito, ya que ellas miden la actividad de varias enzimas deshidrogenasas, porque el anillo de tetrazolio es reducido en mitocondria activas y entonces, la reacción ocurre únicamente en células vivas³¹.

Mosmann y colaboradores, en 1983, describieron y desarrollaron un ensayo rápido, colorimétrico, basado en la sal de tetrazolio MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolio)³¹. Subsecuentemente fue investigado por el National Cancer Institute en 1986 para su uso *in vitro* en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Este ensayo mide solo células vivas y pueden ser leído en un espectrofotómetro multicanal (Lector de ELISA)³¹.



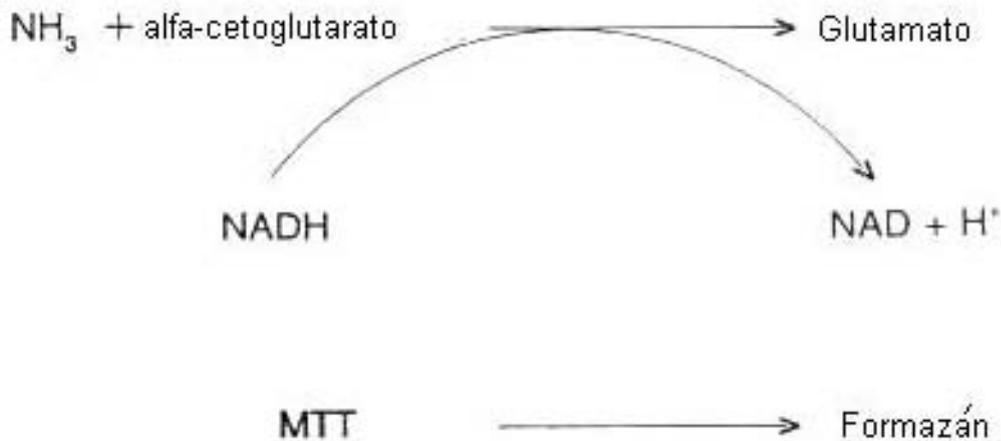
Mosmann midió la generación de formazán por células metabólicamente inactivas (eritrocitos), células en reposo (células del bazo) y células activadas (linfocitos estimulados con Con-A), mostrando que ni las células rojas de la sangre reducen el MTT a un significativo alcance y que ninguna de las células rojas interfiere significativamente en el ensayo, arriba de las concentraciones de 2×10^6 células/mL. Linfocitos activados con Con-A produce aproximadamente 10 veces más formazán que las no activadas³¹.

El MTT es reducido por todas las células vivas, células activas metabólicamente pero no por células muertas o eritrocitos. La cantidad de formazán generada es directamente proporcional al número de células, sobre un amplio rango, usando una población de células homogéneas. Las células activadas producen más formazán que las células en reposo, las cuales pueden permitir la medición de la activación aún en ausencia de proliferación. Estas propiedades son todas consistentes con la reducción de MTT solo para mitocondrias activas. La idea general es que esta actividad metabólica requiere función mitocondrial.

El MTT es un sustrato amarillo pálido que al ser reducido por la deshidrogenasa mitocondrial (cadena respiratoria) en células vivas incubadas, da un producto (formazán) de color azul- púrpura. El producto de la reacción de MTT, formazán, es parcialmente soluble en el medio, pero se puede disolver con un disolvente orgánico (Dimetilsulfóxido (DMSO)) o en un alcohol (etanol, isopropanol) y producir una solución homogénea apropiada para medir la densidad óptica de una manera fácil y rápida. Éste puede ser cuantificado en una placa convencional de ELISA y puede ser leído a 570 nm (máximo de absorbanza).

Las sales de tetrazolio han sido ampliamente utilizadas para la cuantificación de la capacidad reductora celular. Estas sales aceptan electrones de sustratos oxidados o coenzimas apropiadas incluyendo NADH o NADPH, lo cual resulta en su reducción al producto colorido formazán. El MTT descrito primero por Beyer y Pyl es fácilmente reducido por donadores de electrones como NADH o NADPH. Recientes estudios con el sistema succinato deshidrogenasa (estas enzimas forman parte de un complejo de 25 enzimas que componen el complejo I de la cadena respiratoria) en homogeneizados de hígado de rata, indican que el MTT es reducido en la ubiquinona y en los sitios de los citocromos b y c del sistema mitocondrial de transporte de electrones³⁰. Sin embargo, esta no es una evidencia sustantiva que indique que la reducción de MTT esta limitada a las mitocondrias³⁰.

El hecho de que las sales de tetrazolio son ampliamente utilizadas en inmunohistoquímica para la demostración de enzimas mitocondriales, específicas sugiere que la reducción de MTT puede ocurrir en múltiples sitios celulares. (El NAD también se puede localizar en el citosol y puede reducir al MTT (Alberts et al 2000)



1.7.1 APLICACIONES.

El ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) es ampliamente usado para mediciones *in vitro* de la viabilidad metabólica de cultivos celulares sujetos a diferentes condiciones de cultivo.

Ya que el sistema “succinato-tetrazolio reductasa” pertenece a la cadena mitocondrial respiratoria, es activa solo en células viables. Por eso, este ensayo es comúnmente utilizado para estimar la viabilidad celular en protocolos de seguimiento de fármacos y en ensayos de quimiosensibilidad ya que mide la actividad metabólica; también es ampliamente usado para cuantificar la proliferación celular y la citotoxicidad.

Como las células proliferativas son metabólicamente más activas que las no proliferativas, este ensayo es apropiado no solo para la determinación de células viables y la medida de la citotoxicidad, sino también para la activación y proliferación de las células en respuesta a mitógenos (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Con-A, LPS, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fitohematoglutinina). Sin embargo, uno tiene que tener en mente que, bajo condiciones no ideales (como por ejemplo una variación del pH o en la concentración de glucosa en el medio de cultivo) la respuesta del MTT puede variar enormemente en células viables debido al estado metabólico de las células. Se puede usar el ensayo para medir producción de linfocinas, estimulación con mitógenos y lisis mediada por complemento³¹.

1.7.2 VENTAJAS.

- El ensayo MTT detecta específicamente células viables.
- La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células viables usadas en el ensayo; la señal generada es dependiente del grado de activación de las células. Este resultado indica que el ensayo es capaz de detectar un número muy pequeño de células vivas (por ejemplo 200) aumentando la posibilidad de que la cantidad de formazán generado por célula dependa del nivel metabólico de la célula.
- El ensayo es no radioactivo y puede ser realizado en su totalidad en una placa de ELISA, utilizando un lector de placas que mida la absorbancia en pozos individuales. Esto es apropiado para la medida de la proliferación celular, viabilidad celular o citotoxicidad.
- El MTT es metabolizado por todas las células es decir, puede ser usado por todos los tipos de células. Esto incluye linfocitos T y B estimulados con un mitógeno, células de mieloma, linfoma T y líneas celulares tumorales, así como varias líneas celulares T dependientes de IL-2. Tal vez también sea aplicable para el ensayo de linfocitos T citotóxicos.
- La proporción de la reducción de MTT es lineal sobre un periodo de 4 horas.
- El ensayo se realiza en placas y por consiguiente es fácil manejar una gran cantidad de muestras; permiten evaluar varias réplicas y el volumen de reactivo requerido es 5 a 10 veces menor que en métodos de conteo celular.
- Este ensayo es una técnica apropiada para aplicación de rutina de quimiosensibilidad.
- Otra ventaja del ensayo incluye la baja variación de los datos entre los ensayos ($\pm 15\%$ DS).
- Muestra un alto grado de precisión.
- El sustrato no interfiere con la medida del producto y se encontraron condiciones en las cuales los componentes del medio no interfieren. Esto permitió que el ensayo sea leído sin remover medio o hacer pasos de lavado, lo cual incrementa la velocidad del ensayo y ayuda a minimizar la variabilidad entre

muestras. Los estados finales del ensayo (adición del MTT, lectura de la placa e impresión de datos) toma mucho menos tiempo.

- El color es estable por algunas horas a temperatura ambiente.
- Los resultados son también aparentemente visuales, lo cual es muy útil si se requieren resultados cualitativos rápidos.
- En la práctica no se observan grandes diferencias entre el ensayo colorimétrico, ensayos con radioisótopos o la inspección visual de los pozos.
- No se necesita un contador- γ o de centelleo.
- El ensayo colorimétrico comparte con los ensayos de radioisótopos las ventajas de cuantificación precisa y la compatibilidad de programas de computadora.
- Dado que el ensayo colorimétrico es tan rápido, una gran cantidad de datos pueden ser generados.
- El uso del ensayo colorimétrico para crecimiento y viabilidad celular, desarrollado en placas de pozos, en conjunto con pipetas multicanal y un espectrofotómetro automático, ofrece mayores ventajas en la rapidez, simplicidad, costo y seguridad sobre otros ensayos convencionales usando la captación de compuestos radioactivos.

1.7.3 DESVENTAJAS.

- Es importante validar el ensayo para cada tipo de célula.
- Células con baja actividad metabólica (por ejemplo linfocitos no estimulados) deben ser usadas en alta cantidad
- La agitación durante la incubación tiene un poco de influencia en la producción de formazán, comparado con una combinación aeróbica, normal en tubos no agitados.
- El sistema succinato-tetrazolio reductasa es, en general, un sistema complejo afectado en muchos casos por niveles de oxígeno en la incubación.
- Una característica limitante de este ensayo es el análisis de los datos que obviamente requiere el uso apropiado de un software, el cual no es generalmente disponible.
- El formazán varía entre líneas celulares y el tiempo de cultivo. Una correlación fue establecida entre la concentración de D-glucosa del medio de

cultivo en el tiempo del ensayo y la formación de formazán para cada línea celular. Una disminución en la concentración de D-glucosa del medio de cultivo fue acompañado por una disminución en la reducción del MTT; las células que metabolizan extensamente D-glucosa exhibieron una gran reducción específica del MTT (por ejemplo las líneas celulares SNRK1 de carcinoma renal y la HOP62 de adenocarcinoma de pulmón metabolizan el azúcar extensivamente). El transporte celular y metabolismo constante de glucosa fue requerido para un máximo de reducción de MTT. Estos resultados indican que la actividad específica del MTT es significativamente influenciada por un número de parámetros y sugiere que las condiciones de ensayo deben ser establecidas para minimizar estos efectos.

- Inicialmente el etanol fue usado para disolver el formazán pero algo de precipitación de proteínas del suero ocurrió en la mezcla alcohol-ácido. Algunos otros solventes orgánicos fueron probados y el isopropanol fue la solución más apropiada
- Este ensayo puede ser afectado significativamente por numerosas condiciones. Estas condiciones pueden ser divididas en 2 grupos: primero, las influencias que afectan el espectro del formazán producido; segundo, las influencias que afectan la cantidad de formazán producido por las células. Por ejemplo, para el primer caso, algunas líneas celulares son sensibles a cambios de pH, por ejemplo MCF-7, ya que al ser disueltos los cristales de formazán en DMSO y HCl la absorbancia se reduce notablemente pero si se añade NaOH (después del HCl) la absorbancia se ve mejorada; es esencial además remover el medio-MTT como sea posible antes de la adición de DMSO para evitar cambios del espectro. La alta densidad celular o la acidez del medio, incrementa la disminución en la absorbancia, cuando el medio no es removido inmediatamente antes de ejecutar el ensayo. La ausencia del buffer Hepes en el medio de cultivo resulta en una disminución significativa (arriba del 60%) en las absorbancias leídas a 540 nm cuando son comparadas con medio de cultivo que contienen Hepes. Mientras que la ausencia o presencia de suero o rojo de fenol no influye. Un cambio en el espectro también puede ocurrir como resultado de la calidad del DMSO utilizado, por ejemplo, el color del formazán producido por las células T47-D después de 2 días en cultivo, disuelto en DMSO, calidad pro-análisis, fue rojo-café, mientras que el uso de DMSO calidad Uvasol dió una solución rojo-púrpura. El cambio del espectro fue acompañado con una disminución del 30% de

absorbancia a 540 nm. Cuando las placas de cultivo conteniendo formazán/DMSO (calidad Uvasol) fueron expuestas al aire durante 4 y 24 horas se observó una disminución de la absorbancia del 10% y 30%, respectivamente. Un control del pH durante la incubación de las células con MTT y después, disolviendo los cristales de formazán en DMSO, parece ser extremadamente importante. Esto puede ser conseguido por una renovación del medio de cultivo con Hepes, inmediatamente antes de la incubación con MTT. Para el segundo caso, la proliferación celular produce más formazán que las células carentes de factores esenciales para la proliferación. Este fenómeno es una de las mayores ventajas del uso del ensayo de MTT: la habilidad de medir en un tiempo relativamente corto diferencias de actividad metabólica³².

- Aunque para muchos tipos de células el MTT y la captación de timidina [H^3] dan un resultado similar, otras células tal vez reducen la sensibilidad con el MTT, por ejemplo, los blastos de células T activadas con Con-A producen mucho menos formazán que EL4.

En general el procedimiento incluye:

- Cultivo celular en una placa de 96 pozos, después incubación con solución de MTT por aproximadamente 4 horas. Durante el periodo de incubación la células viables convierten el MTT a formazán (insoluble en agua)
- Solubilización de formazán en la placa de 96 pozos. La solubilización puede ser realizada con solventes orgánicos por ejemplo 4 mL de acetato de etilo, alcohol (etanol/ácido o isopropanol/ácido) o DMSO.
- Cuantificación de la coloración con un lector de ELISA. La absorbancia es directamente proporcional con el número de células, usando una longitud de onda de referencia de 630 nm y una longitud de onda de medida de 570 nm. El espectro de absorbancia para MTT-formazán varía con el método usado para detener la reacción enzimática. Si se usa el ácido tricloroacético el máximo de absorción es 430 nm mientras que con saturación de $(NH_4)_2SO_4$ es a 560 nm.

1.8. La Respuesta Inflamatoria.

Cuando se lesiona un tejido, ya sea por bacterias, un traumatismo, sustancias químicas, calor u otros fenómenos, sus células liberan múltiples sustancias que aumentan la permeabilidad capilar y provocan la extravasación de plasma y células sanguíneas. Como una consecuencia se producen cambios secundarios en los tejidos lesionados. El conjunto de esos cambios titulares se denomina inflamación.

La inflamación depende en una buena parte de las proteínas y de las células sanguíneas que se salen de los vasos capilares. Normalmente se encuentran seis tipos de leucocitos en la sangre y todos ellos pueden activarse e infiltrar los tejidos inflamados. Se les conoce como los neutrófilos polimorfonucleares, los eosinófilos polimorfonucleares, los basófilos polimorfonucleares, los monocitos, los linfocitos y en ocasiones las células plasmáticas. Los tres primeros tipos de células, los células polimorfonucleares, tienen todas ellas un aspecto granular por lo que se les llama granulocitos o en la terminología clínica “poli” por sus múltiples núcleos. Los granulocitos y monocitos protegen al organismo frente a los microorganismos invasores principalmente mediante su ingestión, es decir por fagocitosis. Los linfocitos y las células plasmáticas actúan principalmente en conexión con el sistema inmunitario.

1.8.1 LA INFLAMACIÓN.

La palabra inflamación derivada del latín “*flamma*” –llama, fuego- y se puede definir como una respuesta, generalmente local, de un organismo vivo frente a una agresión y/o una lesión de tejidos. Las características de la inflamación fueron ya descritas por Celso en el año treinta de nuestra era y consiste en la presencia de dolor, aumento de temperatura, tumefacción y enrojecimiento. Estos cuatro signos (descritos por Galeno) –calor, rubor, tumor y dolor- junto con el de impotencia funcional la cual fue descrita por Virchow en 1858 en su “Patología celular” constituyen los hallazgos fundamentales de cualquier proceso inflamatorio.

La inflamación es, en general, un mecanismo de defensa tisular. El proceso inflamatorio es un arma de doble filo, pues en ocasiones conlleva efectos secundarios indeseables como ocurre, por ejemplo, en las enfermedades autoinmunes o en las

reacciones anafilácticas. Una inapropiada o no regulada respuesta es el centro para una amplia variedad de enfermedades en humanos.

El estímulo desencadenante de la inflamación varía en cada caso e incluye agentes físicos o químicos, microcristales, bacterias, virus, hongos, complejos inmunes, sustancias antigénicas, etc.

La respuesta inflamatoria es una compleja serie de eventos fundamentales para proteger el cuerpo contra cualquier daño y para detener la invasividad de los agentes infecciosos. Una característica destacada de la inflamación es la reacción de la vasculatura en el sitio del daño. El endotelio vascular, una serie de proteínas del plasma y los leucocitos se combinan para proteger al cuerpo del daño.

El proceso inflamatorio incluye una serie de fenómenos que pueden ser desencadenados por diversos estímulos (agentes infecciosos, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo, y lesiones térmicas o físicas de otra índole). A nivel macroscópico, la respuesta por lo común se acompaña de los conocidos signos clínicos como eritema, edema y dolor (hiperalgesia) a la palpación o espontáneamente. Las respuestas inflamatorias pueden clasificarse en tres grandes grupos según su duración y cada una al parecer es mediada por mecanismos distintos: 1) una fase transitoria aguda que se caracteriza por vasodilatación local y mayor permeabilidad capilar; 2) una fase subaguda tardía que se identifica más bien por infiltración de leucocitos y fagocitos, y 3) una fase proliferativa crónica en que se advierten degeneración y fibrosis tisulares.

A nivel celular, la respuesta inflamatoria es caracterizada por la movilización e infiltración de neutrófilos, leucocitos mononucleares y macrófagos en el sitio de inflamación. La infiltración de células produce una multitud de moléculas biológicamente activas que indican una cascada de señales de eventos intra e intercelulares capaces de afectar células linfoides y no linfoides; así, macrófagos, linfocitos, fibroblastos sinoviales y células endoteliales son activados para producir mediadores adicionales que además perpetúan la respuesta inflamatoria.

La inflamación se caracteriza por: 1) la vasodilatación de los vasos sanguíneos locales, con el consiguiente exceso de flujo sanguíneo local; 2) el aumento de la

permeabilidad de los capilares, con el paso de grandes cantidades de líquido en los espacios intersticiales; 3) a menudo, la coagulación del líquido en los espacios intersticiales, por una cantidad excesiva de fibrinógeno y de otras proteínas que salen de los capilares; 4) la migración de un gran número de granulocitos, monocitos y linfocitos al tejido dañado; y 5) la tumefacción de las células tisulares. Algunos de los muchos productos tisulares que provocan esta reacción son la histamina, la bradicina, la serotonina, las prostaglandinas, los diferentes productos de reacción del sistema del complemento, los productos de reacción del sistema de coagulación de la sangre, y numerosas citocinas diferentes que son liberadas por las células T sensibilizadas y por los macrófagos.

Desde el punto de vista fisiopatológico, la inflamación consta de dos fases: vascular y celular. El primer paso del proceso inflamatorio es la contracción transitoria de las arteriolas, a la que sigue una vasodilatación, con el consiguiente aumento de la permeabilidad vascular y exudación plasmática. La vasodilatación es la causa del aumento de temperatura y del enrojecimiento local. El aumento de la permeabilidad capilar ocasiona exudación plasmática y con ello tumefacción y dolor. La reacción vascular se debe a la activación que produce el estímulo flogótico sobre los mediadores humorales (Factor de Hageman, cininas, prostaglandinas, neuropéptidos, etc.) que van a reclutar, amplificar y modular a los diferentes actores del proceso inflamatorio. La fase celular consiste en la emigración al foco inflamatorio de fagocitos (polimorfonucleares, monocitos y macrófagos) y de células inmunitarias (linfocitos T y B, células plasmáticas, etc.), así como de otras células (plaquetas, fibroblastos y mastocitos) cuyo metabolismo se vuelve sumamente activo en esta fase. La mayoría de estas células proceden de la sangre, de donde salen hacia el espacio extravascular mediante un proceso de diapédesis.

Uno de los primeros resultados de la inflamación es la “tabicación” del área de lesión, la cual queda separada del resto de los tejidos. Los espacios tisulares y los linfáticos del área de inflamación se bloquean con coágulos de fibrinógeno, de forma que el líquido apenas puede pasar a través de los espacios. Este proceso de tabicación retrasa la extensión de las bacterias o de los productos tóxicos. La intensidad del proceso inflamatorio suele ser proporcional al grado de lesión tisular.

A los pocos minutos de comenzar la inflamación, los macrófagos ya presentes en los tejidos comienzan de inmediato las acciones fagocíticas. Cuando se activan por los productos de la infección y de la inflamación, el primer efecto es un aumento rápido de tamaño de cada una de estas células. Después, muchos de los macrófagos previamente sensibles se separan de sus uniones y se hacen móviles, formando la primera línea de defensa contra la infección durante la primera hora más o menos.

En la primera hora más o menos del comienzo de la inflamación, un gran número de neutrófilos empieza a invadir el área inflamada desde la sangre. La causa está en los productos de los tejidos inflamados, que inician las siguientes reacciones: 1) alteran la superficie interna del endotelio capilar, en donde se expresan nuevas moléculas de adhesión, las cuales causan la adhesión de los neutrófilos a la superficie interna de las paredes capilares en el área inflamada; este efecto se llama marginación, 2) hacen que las células endoteliales de los capilares y de las pequeñas vénulas se separen fácilmente formando aberturas suficientemente grandes para que el neutrófilo las atraviese mediante diapédesis camino de los espacios tisulares y 3) otros productos de la inflamación producen la quimiotaxis de los neutrófilos hacia los tejidos lesionados.

Varias horas después de que la lesión tisular comienza, el área se llena de neutrófilos, debido a que los neutrófilos sanguíneos son ya células maduras, están preparadas para comenzar de inmediato sus funciones de limpieza para destruir bacterias y eliminar materia extraña.

También en la primeras horas del comienzo de la inflamación aguda intensa, el número de neutrófilos en la sangre circulante a veces aumenta cuatro a cinco veces: desde lo normal de 4000 a 5000 neutrófilos por microlitro a 15 000 a 25 000. A esto se le llama neutrofilia, que significa aumento de neutrófilos en la sangre. La neutrofilia esta producida por los productos de la inflamación que entran en el torrente sanguíneo (particularmente algunas citocinas producidas por los macrófagos activos), que después son transportados a la médula ósea y allí actúan sobre las células precursoras de los leucocitos, sobre los capilares medulares y sobre los neutrófilos almacenados para movilizarlos de inmediato hacia la sangre circulante. Esto hace que haya más neutrófilos disponibles para el área de tejido inflamado.

Junto a la invasión de los neutrófilos, los monocitos de la sangre también pasan al espacio intersticial y entran en el tejido inflamado y aumentan de tamaño hasta convertirse en macrófagos. El número de monocitos en la sangre circulante es escasa, la reserva almacenada de monocitos en la médula ósea es mucho menor que la de neutrófilos. Por tanto la acumulación de macrófagos en el área de tejido inflamado es mucho menor que la de neutrófilos. Después de invadir el tejido inflamado, los monocitos son todavía células inmaduras que necesitan 8 o más horas para aumentar de tamaño y sintetizar cantidades elevadas de enzimas proteasas que transportan hacia los lisosomas; solo después de ello adquiere su total capacidad para la fagocitosis. Tras varios días o semanas, a medida que se prolonga la respuesta inflamatoria, los macrófagos llegan a dominar finalmente las células fagocíticas del área inflamada a causa de una producción muy elevada de ellos en la médula ósea. Los macrófagos pueden fagocitar muchas más bacterias y partículas mucho más grandes que los neutrófilos, entre ellos los propios neutrófilos y grandes cantidades de tejido necrótico.

La cuarta línea de defensa es una producción muy aumentada de granulocitos y de monocitos en la médula ósea. Esto es el resultado de la estimulación de las células progenitoras granulocíticas y monocíticas de la médula. Sin embargo, los granulocitos y monocitos formados, tardan de 3 a 4 días en alcanzar el estadio de abandonar la médula ósea. Si el estímulo del tejido inflamatorio continúa, la médula ósea puede seguir produciendo estas células en cantidades enormes durante meses e incluso años, a veces con una producción de 20 a 50 veces más de lo normal y las consecuencias serían un proceso inflamatorio crónico.

Para estimular el inicio y el desarrollo de la respuesta de macrófagos-neutrófilos en el sitio de la inflamación, existen cinco factores solubles que actúan como pro-inflamatorios: 1) el factor de necrosis tumoral (TNF); 2) la interleucina-1 (IL-1); 3) el factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF); 4) el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y 5) el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF).

Los factores pro-inflamatorios los forman activamente los macrófagos y las células T en los tejidos inflamados. La causa de la producción aumentada de granulocitos y monocitos en la médula ósea son, principalmente, los tres factores estimulantes de

colonias, uno de los cuales, el GM-CSF, estimula tanto la producción de granulocitos como la de monocitos, y los otros dos, el G-CSF y el M-CSF, la producción de granulocitos y monocitos, respectivamente. Esta combinación de TNF, IL-1 y los factores estimulantes de colonias, junto a otros factores importantes, proporciona un poderoso mecanismo de retroalimentación positiva que comienza con la inflamación del tejido, sigue después con un aumento en la formación de leucocitos defensivos y finalmente con la eliminación de la causa de la inflamación.

En la inflamación intervienen de manera esencial diversos tipos de células. Las más importantes al inicio son las células endoteliales, las cuales se activan y aumentan la expresión sobre su membrana de diversas moléculas de adhesión celular (CAM) que incluyen selectinas E, la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1), la molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y las β -integrinas leucocíticas en la adhesión de leucocitos, plaquetas y células de endotelio en los sitios de inflamación. Las células endoteliales activadas intervienen en forma fundamental para precondicionar y orientar a las células circulantes hacia los sitios de la inflamación. Esto se logra al aumentar la adhesión de las células circulantes al endotelio y hacer más lento su "rodamiento" sobre la superficie endotelial. La expresión de diversas moléculas de adhesión varía según los tipos celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria.

El reclutamiento de células de la inflamación en sitios de lesión incluye las interacciones concertadas de algunos tipos de mediadores solubles. Dichos mediadores incluyen el subcomponente C5a de complemento, el factor activador de plaquetas (PAF) y el leucotrieno B₄, todos ellos agonistas quimiotácticos. Otras citocinas intervienen de forma esencial para concertar el proceso inflamatorio y en particular la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF). La IL-1 y el TNF provienen de mononucleares y macrófagos e inducen la expresión de los productos de varios genes, lo cual facilita y/o incrementa los fenómenos inflamatorios. Además, hay que tomar en cuenta la participación de los factores de crecimiento (como el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos; GM-CSF) y otras citocinas, como la IL-8 y citocinas quimiotácticas similares (quimocinas), que también estimulan la infiltración y activación de neutrófilos. La concentración plasmática de IL-1 aumenta en sujetos con algunos procesos inflamatorios. La IL-1 y el TNF producen muchas de las mismas respuestas inflamatorias que incluyen inducción de fiebre, sueño y anorexia; movilización y activación

de polimorfonucleares; inducción de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa; activación de linfocitos B y T, estimulación de la producción de otras citocinas.

Existe un antagonista natural de los receptores de la interleucina 1 (IL-1ra), el cual a menudo alcanza concentraciones altas en sujetos con diversas infecciones o cuadros inflamatorios. El equilibrio entre IL-1 e IL-1ra tal vez contribuya a la magnitud de la respuesta inflamatoria.

Otras citocinas y factores de crecimiento (como IL-2, IL-6, IL-8 y GM-CSF) contribuyen a la aparición de manifestaciones de respuesta inflamatoria.

La histamina fue una de los primeros mediadores del proceso inflamatorio que fueron identificados. El PAF también interviene como mediador importante de la inflamación. Son vasodilatadores.

Durante el proceso inflamatorio la bradicina liberada a partir del fibrinógeno plasmático y de citocinas como $TNF\alpha$, IL-1 e IL-8, al parecer tienen particular importancia en la producción del dolor; dichos agentes liberan prostaglandinas y tal vez otros mediadores que estimulan la hiperalgesia. Los neuropéptidos, como la sustancia P (SP) y el péptido producido por el gen de calcitonina, también intervienen en la producción del dolor.

La PGE_2 , al aumentar la cantidad de AMPc, estimula al hipotálamo para elevar la temperatura corporal. Los NSAID suprimen esta respuesta al inhibir la síntesis de PGE_2 .

A continuación se mencionan las características de los principales mediadores humorales y celulares que participan en de la respuesta inflamatoria.

1.8.2 MEDIADORES HUMORALES.

Bajo este concepto se incluyen un amplio grupo de sistemas enzimáticos, péptidos y otras sustancias plasmáticas con efectos e interacciones múltiples.

Inflamación: Mediadores Humorales	
Factor de Hageman	Cininas
Histamina	Serotonina
Complemento	Derivados del ácido araquidónico
Factor activador plaquetario	Proteasas
Radicales libres	Óxido Nítrico
Moléculas de adhesión	Inmunoglobulinas
Citocinas	Neuropeptidos

Factor de Hageman o factor del sistema de la coagulación XII: es una β -globulina que se activa por múltiples estímulos (particularmente por las lesiones o la muerte de los tejidos corporales) y que, a su vez, estimula la activación de otros sistemas que intervienen en la inflamación. Entre sus acciones principales cabe citar: vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, liberación de prostaglandinas, quimiotaxis sobre neutrófilos y monocitos, activación del complemento, activación del propio factor Hageman, activación de la plasmina. Entre los inhibidores del factor Hageman hay que citar al inhibidor del C activado y, en menor proporción, a la α_1 antitripsina y la antitrombina III.

Cininas: son péptidos de bajo peso molecular. La activación de las cininas se produce por medio del factor XII activado. La plasmina (sistema de fibrinólisis), la trombina (sistema de coagulación) y la tripsina son también activadores del sistema de las cininas. El mayor inhibidor de la calicreina plasmática es el inhibidor de C_1 . La α_2 macroglobulina y, en menor grado, la antitrombina III también la inhiben. Como acciones propias de las cininas cabe destacar: vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, hipotensión, dolor, interacción con terminaciones nerviosas, quimiotaxis, activación del complemento por la vía clásica, transformación del plasminógeno en plasmina, liberación de prostaglandinas.

Histamina: procede de la descarboxilación de la histidina. Es una amina sintetizada y almacenada en la mayor parte de los tejidos en forma de depósitos intracelulares en basófilos, mastocitos y plaquetas. Entre los estímulos que provocan su liberación hay que citar la IgE, que induce la desgranulación de basófilos y mastocitos; el PAF que libera histamina desde las plaquetas, la plasmina y las enzimas polimorfonucleares que liberan histamina. En cuanto a su papel en la inflamación sus efectos son mediados por dos tipos de receptores: H_1 y H_2 , cuya estimulación produce según el tejido en donde se encuentren: aumento en la permeabilidad vascular, inhibición

de la quimiotaxis y de la liberación de enzimas lisosomales de neutrófilos, modula la quimiotaxis de eosinófilos, modula la proliferación de linfocinas, bloquea diversas funciones de los linfocitos T. La histamina, aunque producida por células del sistema inmune, es un neurotransmisor importante y una gran parte de sus receptores se encuentran en el cerebro. Los antihistamínicos por lo general producen somnolencia.

Serotonina: es otro neurotransmisor que se sintetiza a partir del triptófano, almacenándose en las células enterocromafines de la mucosa digestiva, sistema nervioso y en los gránulos densos de las plaquetas. La presencia de inmunocomplejos del sistema de la coagulación liberan serotonina de las plaquetas. En la inflamación, la serotonina interviene en las siguientes acciones: induce la producción de un factor quimiotáctico para monocitos, aumenta el número de fibroblastos y la síntesis de colágeno, causa activación y agregación plaquetaria.

Complemento: es un conjunto de moléculas séricas implicadas en el inicio y el control de la inflamación, la eliminación de inmunocomplejos, la presentación de antígenos, la lisis de microorganismos patógenos y la fagocitosis de células sensibilizadas por anticuerpos. Lo componen aproximadamente 20 proteínas plasmáticas que participan tanto en la activación como en la regulación del sistema. Los componentes clásicos son 9 y se identifican con la letra C y con un número a continuación (C1, C2, C3, etc.). Los factores que participan en la activación y el control de la vía alternativa se designan con una letra mayúscula que puede ser B, D, P (properdina), H e I. Una raya sobre una letra o un número, como en D, indican una proteína enzimáticamente activa. Cuando se trata de nombrar los fragmentos producidos por la ruptura enzimática de los componentes se utilizan subfijos con letras minúsculas, por ejemplo, C3a, C3b. La activación se produce por una secuencia de cascada. Se pueden distinguir tres subsistemas: hay tres vías de activación, la clásica, la alternativa, y de la manosa una secuencia efectora final común C3-C9.

Vía clásica consta de tres componentes principales: C1, C2 y C4. El C1 se compone a su vez de tres glucoproteínas: C1q, C1r y C1s, unidas en un complejo calcio dependiente. La activación del C1 se produce por la formación de inmunocomplejos, después de la unión de antígenos con las inmunoglobulinas IgG e IgM.

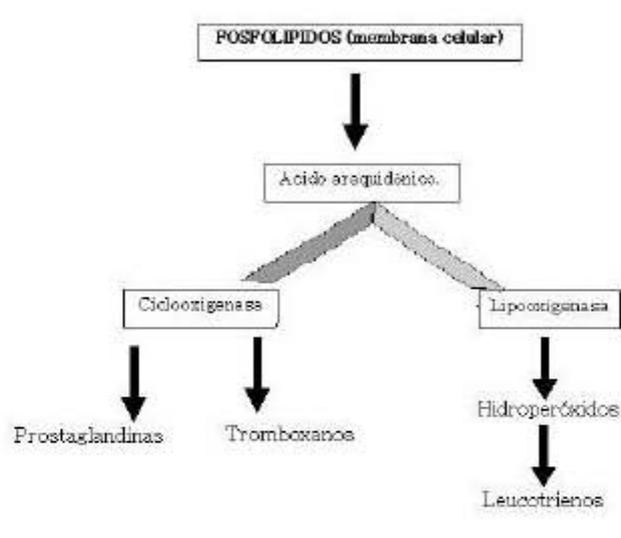
Vía alternativa: consta de tres componentes protéicos: B, D y properdinas (P), a los que hay que añadir dos proteínas: H e I, que inactivan al C3b. La vía alterna se activa por polisacáridos, endotoxinas bacterianas, plasmina e inmunoglobulinas.

Las acciones mediadas por el sistema del complemento en la inflamación se pueden resumir en:

Acciones vasculares. C4a y C2b producen aumento de la permeabilidad vascular; C3a y C5a son anafilotoxinas que liberan histamina de basófilos y mastocitos y serotonina de plaquetas, con la consiguiente vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular.

Interacciones celulares. Actividad quimiotáctica C3a, C5aC3bBb. C3a inhibe las respuestas celulares de los linfocitos B. La secuencia terminal del complemento C5b-C9 produce citólisis osmótica.

Derivados del ácido araquidónico. El ácido araquidónico se encuentra formando parte de los fosfolípidos de las membranas celulares de los mamíferos. El ácido araquidónico es liberado en respuesta a ciertos estímulos que activan las fosfolipasas de la membrana celular. Sobre el ácido araquidónico libre actúan dos vías enzimáticas que dan origen a distintos productos, son las vías de las ciclooxigenasas (prostaglandinas y tromboxanos) y la vía de la lipooxigenasa (leucotrienos).

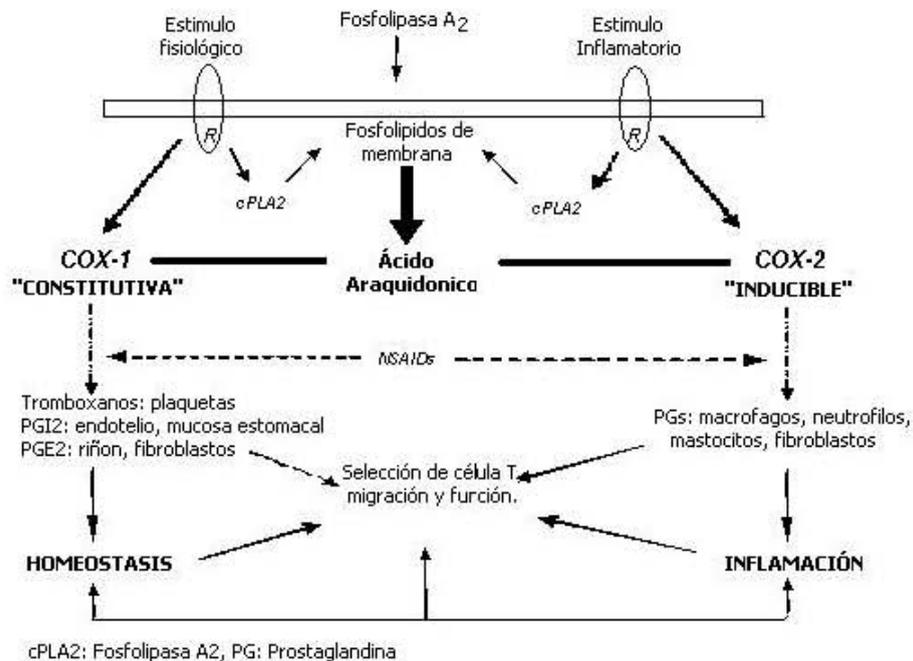


Formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos

(Tomado de Gijón Baños J. *Inflamación y dolor. Conceptos básicos.* Grupo Aula Médica 1997 Pp. 1-18)

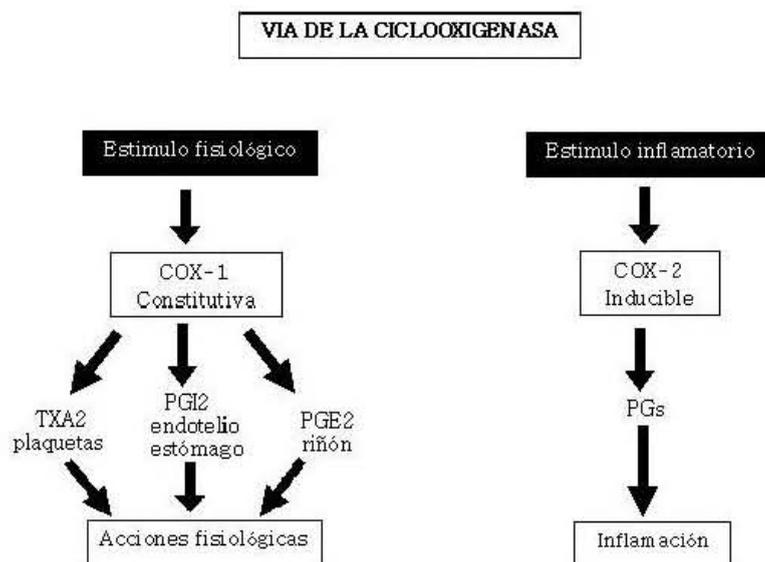
Vía de la Ciclooxygenasa. La acción de la Ciclooxygenasa (COX) sobre el ácido araquidónico da lugar a la formación de endoperóxidos, prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina. Se conocen dos tipos de Ciclooxygenasa: una enzima constitutiva, que se encuentra en todas las células (Cox-1), y una enzima inducible por la acción de diversas sustancias proinflamatorias (Cox-2). La conversión del ácido araquidónico a prostanoides está mediada por unas reacciones catalizadas por ciclooxygenasas (Cox-1 y Cox-2 que están codificadas por dos únicos genes, localizados en diferentes cromosomas. Como ya se mencionó, Cox-1 es generalmente expresado constitutivamente, mientras que la expresión de Cox-2 es altamente inducible. Basado en sus respectivos modos de expresión, se cree que Cox-1 está involucrado primariamente en la homeostasis celular mientras que Cox-2 juega un papel mayor en la inflamación y mitogénesis. Una vez iniciada la síntesis por la Cox-1/Cox-2, el tipo de prostaglandina producida dependerá de la isomerasa que posea cada tejido.

En la actualidad se están ensayando nuevos fármacos antiinflamatorios que sean capaces de discriminar entre estos dos mecanismos enzimáticos con el objetivo de inhibir la COX2 sin perturbar las acciones fisiológicas de la Cox-1. Todos estos compuestos nuevos tienen complejos y variados efectos sobre la respuesta inflamatoria.



Formas de generación de prostanoides y su papel en la homeostasis e inflamación
 Tomado de Serhan Charles N., *Molecular and cellular basis of inflammation*. Humana Press. 1999, Pp. 294-

Al analizar la vía de la ciclooxigenasa, se puede observar que sus productos tienen acciones muy importantes relacionadas con la respuesta inflamatoria. La mayoría de los productos que se forman por la actividad de esta enzima producen vasodilatación (PGE_1 , PGE_2 , PGD_2 y PGI_2); la PGF_2 y el Tromboxano A_2 , en cambio, son vasoconstrictores; este último a su vez induce agregación plaquetaria, mientras que la PGI_2 inhibe su agregación. Las prostaglandinas producen en general quimiotaxis sobre polimorfonucleares y macrófagos. La PGE_2 y la PGI_2 inhiben o disminuyen las respuestas de los linfocitos T. PGE_2 es conocida por suprimir la proliferación de células T y la producción de IL-2 en muchas condiciones inflamatorias. El tratamiento de animales inyectados, con un bloqueador de síntesis de PGE_2 (indometacina) evita la disminución de NFAT y AP-1 unido a secuencias de IL-2.



Vía de la ciclooxigenasa: acciones fisiológicas e inflamatorias mediadas por COX1 y COX2.

(Tomado de Gijon Baños J. *Inflamación y dolor. Conceptos básicos*. Grupo Aula Médica 1997 Pp. 1-18)

Vía de la Lipooxigenasa. El ácido araquidónico puede ser también sustrato de diferentes lipooxigenasas, produciendo una amplia variedad de sustancias biológicamente activas. La enzima más importante es la 5-Lipooxigenasa, que se encuentra exclusivamente en neutrófilos, macrófagos, células cebadas y eosinófilos, y que produce Leucotrienos (LTs), que son mediadores de la respuesta inflamatoria aguda y de numerosas reacciones de hipersensibilidad. Los leucotrienos LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 aumentan la permeabilidad vascular, producen vaso y broncoconstricción, incrementan la

quimiotaxis y la adhesión de polimorfonucleares y macrófagos. LTB_4 también inhibe a los linfocitos T

En adición al papel directo de los prostanoideos como mediadores de la inflamación, PGs y LTs también modulan las funciones de linfocitos. Por ejemplo, los eicosanoides están involucrados en la selección negativa y positiva de los timocitos CD4^+ y CD8^+ y además influyeron el balance entre CD4/CD8 (+). PGE_2 y LTs inhiben la apoptosis de timocitos mientras que el Tromboxano A_2 promueve la apoptosis vía PGE_2 , influenciando así el proceso de selección. La función de las células B también es afectada por eicosanoides por medio de selección diferencial de linfocitos B maduros contra inmaduros; PGE_2 inhibe la función de linfocitos B maduros, ya que ésta induce la apoptosis en células B inmaduras.

Los eicosanoides incrementan la habilidad de las células T para migrar a través de la membrana por estimulación quimiotáctica y por incremento en su producción de metaloproteínas, las cuales están involucradas en la degeneración de la membrana.

Factor activador de plaquetas (PAF): es un fosfolípido que se encuentra en diferentes células, entre las que cabe citar neutrófilos, basófilos, macrófagos y plaquetas. En la respuesta inflamatoria produce: agregación plaquetaria, liberación de serotonina y prostaglandinas desde las plaquetas, quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos, degranulación de neutrófilos, aumento de permeabilidad vascular, expresión de moléculas de adhesión sobre el endotelio.

Proteasas: Las proteasas son mediadores importantes de la degradación de la matriz extracelular en el proceso inflamatorio. Existen cuatro tipos de proteasas: dos activas a pH ácido (aspartatoproteasas y cisteínproteasas) y otras dos a pH neutro (serínproteasas y metaloproteasas). Estas proteasas se encuentran en los lisosomas de neutrófilos, monocitos, macrófagos, endotelio vascular y fibroblastos entre otras células.

Aspartatoproteasas: la principal proteasa de este grupo es la catapepsina D, que se encuentra en el interior de los lisosomas de la mayoría de las células. En condiciones inflamatorias se puede secretar al medio extracelular.

Cisteínproteasas: pertenecen a las proteasas ácidas. Entre ellas cabe destacar la catapepsina B, la catapepsina L y la catapepsina N; son enzimas fundamentalmente lisosomales que pueden ser liberadas al medio extracelular.

Serínproteasas: forman parte de las proteasa activas en pH neutro. Las serínproteasas son enzimas que actúan sobre gran parte de las proteínas de la coagulación y de la fibrinólisis, sistemas de complemento y cininas. Son serínproteasas la plasmina, el activador del plasminógeno, la trombina, la calicreína, el C1s y el C1r. La mayor parte de ellas se encuentran en el medio extracelular, en la superficie celular o almacenadas en vacuolas intracelulares.

Metaloproteasas: son proteasa neutras, dependientes del zinc para ejercer su actividad. Entre las principales metaloproteasas hay que citar diversas colagenasas, la estromelisina, las gelatinasas A y B, la metaloelastasa y la metrilisina.

Inhibidores de las proteasas: son moduladores de la actividad de las proteasas. Las metaloproteasas son inhibidas por la α_2 -macroglobulina y por el inhibidor tisular de la proteasa 1 y 2, TIMP-1 y TIMP-2.

Todas estas enzimas participan en la inflamación actuando sobre los sistemas del complemento, coagulación, fibrinólisis, cininas y por su papel central en los procesos de degradación de la matriz extracelular.

Radicales libres: En la inflamación se producen derivados oxigenados altamente reactivos: anión de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) y oxígeno nativo [O]. Los fagocitos polimorfonucleares y los macrófagos producen estos compuestos al ser activados por partículas fagocitables, inmunocomplejos, C3b, C5a y otros estímulos. La activación del metabolismo oxidativo de la membrana celular produce la reducción del oxígeno por medio de la NADPH oxidasa, con formación del radical libre anión superóxido O_2^- . Éste bajo la acción de la superóxido dismutasa, se convierte en H_2O_2 , que en presencia de mieloperoxidasas posee una potente actividad microbicida y de toxicidad tisular potencial. Finalmente, la glutatión peroxidasa y la catalasa transforman el H_2O_2 en H_2O . Las acciones de los radicales libres en la inflamación son: actividad microbicida sobre virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos, generación de

derivados del ácido araquidónico, activación de las colagenasas y gelatinasas leucocitarias.

Óxido nítrico (NO): Es una molécula altamente reactiva. Se sintetiza a partir del aminoácido arginina por la óxido nítrico sintasa; esta enzima se encuentra fisiológicamente en ciertos tejidos y el aumento en su síntesis puede ser estimulada por varios agentes (como las endotoxinas de las enterobacterias) y por procesos de activación celular como los que ocurren en la inflamación. Las principales acciones del NO en la inflamación son la vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de la producción de aniones superóxido por el neutrófilo, inhibición de la proliferación de las células T, citotoxicidad, tanto para las células normales como para las tumorales y para los microorganismos, daño tisular.

Moléculas de adhesión: La migración leucocitaria esta controlada por moléculas de adhesión que controlan el movimiento de los linfocitos entre los tejidos linfoides y la migración de linfocitos, neutrófilos y monocitos a través del endotelio de los capilares hacia los focos inflamatorios. Las moléculas de adhesión pertenecen a diferentes grupos estructurales. Algunas son constitutivas de las células como la integrina y el CR3 de neutrófilos y macrófagos, mientras que otras deben ser inducidas por citocinas o por activación celular, como es el caso de ICAM-1 en endotelio y leucocitos. Los principales grupos que integran las moléculas de adhesión son:

Integrinas: son receptores de membrana que están formados por dos cadenas peptídicas, una α y otra β que atraviesan la membrana. Se fijan, habitualmente, a ligandos cuya secuencia terminal es Arg-Gli-Asp. A este grupo pertenecen la LFA-1 que se localiza en leucocitos y aumentan su adhesión; el CR3 (receptor para componentes del sistema complemento) presente en macrófagos y neutrófilos, que favorece la opsonización y la migración de neutrófilos, y el CR4, presente en macrófagos y que favorece la opsonización. Otras integrinas importantes son las *VLA (Very Late Antigens)* que se caracterizan por aparecer de forma tardía en las células T activadas.

Selectinas: Incluyen entre otras moléculas a GMP-140; que se localiza en el endotelio, los neutrófilos y las plaquetas y participa en la inflamación aguda, en la migración de neutrófilos y en la adhesión plaquetaria. ELAM (molécula de adhesión

leucocitaria a endotelio) se localiza en el endotelio y participa en la migración de neutrófilos. La expresión de la selectina E se limita mas bien a las células endoteliales y aumenta su cantidad en los sitios de inflamación. La selectina P, en cambio se expresa mas en plaquetas y células endoteliales y su acción es intensificada por citocinas.

Moléculas de adhesión intercelular: Pertenecen a este grupo ICAM-1, ICAM-2 y VCAM, que pertenecen a las superfamilia de las inmunoglobulinas. ICAM-1 se localiza en endotelio y leucocitos y aumenta la adhesión intercelular. ICAM-2 se expresa en endotelio aumentando la adhesión endotelial; ICAM-1 e ICAM-2 presentan la misma secuencia N-terminal y se ligan a LFA-1. VCAM aparece en el endotelio; su ligando es VLA-4 y su función es la interacción con linfocitos.

Adhesinas. Son moléculas de una cadena única localizadas en endotelio que conferirían especificidad tisular en la migración celular.

Los antiinflamatorios no esteroideos pueden inhibir la expresión o actividad de algunas de estas moléculas de adherencia celular.

Inmunoglobulinas. Son proteínas específicas sintetizadas por las células plasmáticas en respuesta a un antígeno determinado. Están constituidas por dos cadenas ligeras y dos pesadas, unidas por fuerzas covalentes y puentes disulfuro. Las cadenas pesadas permiten distinguir cinco tipos de inmunoglobulinas (Ig): IgG (dos cadenas γ), IgM (dos cadenas μ), IgA (dos cadenas α), IgD (dos cadenas δ) e IgE (dos cadenas ϵ). A su vez pequeñas variaciones dentro de la estructura de estas cadenas pesadas permiten distinguir varias subclases de inmunoglobulinas. Teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos, cabe distinguir tanto en las cadenas ligeras como en las pesadas una parte variable, la porción Fab, que es diferente en cada inmunoglobulina y es la responsable de la unión específica a un antígeno concreto, y otra constante, la porción Fc, que es la que es capaz de interactuar con diferentes células del sistema inmunológico o del sistema del complemento. Existe una gran cantidad de moléculas que tienen dominios (60-100 aminoácidos) similares u homólogos a los dominios de las inmunoglobulinas. Todas ellas forman la superfamilia de las inmunoglobulinas. En esta familia se incluyen las ICAM y las VLAM, que son moléculas de adhesión intercelular.

Funciones en la inflamación. Las inmunoglobulinas reconocen antígenos específicos, lo cual puede producir las siguientes reacciones: los inmunocomplejos producen activación del PAF, producen lesiones sobre las membranas celulares con lo que activan a las fosfolipasas e inducen la liberación de derivados del ácido araquidónico, al formar inmunocomplejos, las inmunoglobulinas activan el sistema del complemento, la IgG y la IgM fijan el complemento, con lo que pueden desempeñar una actividad citolítica directa, favorecen la opsonización y la fagocitosis del antígeno, la IgM y la IgD expresadas en la superficie de los linfocitos B desempeñan un papel primordial en el reconocimiento de antígenos, las IgE unidas a basófilos y mastocitos sensibilizan estas células de forma que, cuando encuentran el antígeno específico, liberan sus mediadores inflamatorios, facilitan la citotoxicidad de las células T y de las células NK.

Citocinas. Son proteínas o glucoproteínas solubles, de bajo peso molecular. Se originan fundamentalmente en linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y fibroblastos. Son moléculas mediadoras de procesos biológicos normales. Las citocinas inflamatorias son moléculas que participan en la inducción y/o modulación o en la resolución de las reacciones inflamatorias. Se han dividido en dos grandes grupos: las pro- y las anti-inflamatorias; sin embargo, una misma citocina puede tener una u otra actividad según la serie de circunstancias por ejemplo, la IL-6 se clasifica en una y otra familia porque esta molécula se produce en exceso cada vez que se estimulan los macrófagos y otras células y sus receptores específicos se encuentran repartidos en las células de numerosos tejidos.

Entre sus funciones fisiológicas se incluyen la estimulación del crecimiento y la diferenciación de las células hematopoyéticas, linfoides y/o mieloides. Sus acciones se realizan mediante su unión a receptores específicos de membrana en las células diana, que ponen en marcha las vías de segundos mensajeros u otros mecanismos intracelulares. La lista de citocinas es muy numerosa en la actualidad y se incrementa día a día conforme se profundiza en su conocimiento; sus acciones son muy variadas y según sus funciones se les puede clasificar en:

Factores estimulantes de colonias (CSF) entre los que se incluyen el GM-CSF (CSF de granulocitos y monolitos), la IL-3 (interleucina 3), la eritropoyetina, etc.

Factores de crecimiento y diferenciación, que incluye el TGF- β (factor transformador del crecimiento β), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y NGF (Factor de crecimiento epidérmico), G-CSF, M-CSF. GM-CSF.

Citocinas inmunoreguladoras comprenden las interleucinas 2, 4, 5, 7, 9, 10, 11 y el INF- γ (interferón γ)

Citocinas proinflamatorias que engloban al TNF- α (factor de necrosis tumoral) y a las interleucinas 1, 6 y 8. Esta clasificación funcional es un tanto arbitraria, aunado a que ciertas citocinas presentan acciones que se interrelacionan con las de otros grupos. El papel de las citocinas en la inflamación: IL-1 induce la producción de PGE₂ en una amplia variedad de células; es un factor quimiotáctico para neutrófilos, monocitos y linfocitos. El TNF- α produce fiebre, la inducción de producción de colagenasa y prostaglandinas; la IL-6 potencia la síntesis de inmunoglobulinas por los linfocitos B. La IL-8 es un potente factor quimiotáctico para los neutrófilos, genera radicales libres y la liberación de enzimas lisosomales. Dos prototípicas citocinas inflamatorias que son potentes inductores de la síntesis de prostanoïdes son: IL-1 β y TNF- α e IL-6 son producidas y secretadas por linfocitos y monocitos, así como tejidos no linfoides, en respuesta a una variedad de estímulos.

Las citocinas que caracterizan las respuestas inflamatorias del sistema inmune también hacen falta durante el desarrollo embrionario, por lo que cualquier incremento o deficiencia en la síntesis de las citocinas inflamatorias durante el embarazo representa un riesgo potencial que puede repercutir sobre las funciones del sistema nervioso central, después del nacimiento.

Neuropéptidos: Son péptidos liberados desde las terminaciones nerviosas que participan en la transmisión de señales entre distintas células del SNC. Muchos de estos neuropéptidos liberados desde fibras sensitivas o autónomas, participan en el proceso inflamatorio. Entre los neuropéptidos implicados en la inflamación cabe citar: sustancia P (SP), neurocininas A y B, somatostatina.

Además de sus numerosas funciones durante el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso central, estas sustancias también inducen cambios en el tono y

permeabilidad vascular, activan los neutrófilos humanos, estimulan la proliferación de linfocitos T, producen anticuerpos por los linfocitos B, generan radicales libres, liberan interleucinas y PGE₂. Son un ejemplo notable de las interacciones que existen los sistemas nervioso e inmune. El efecto que tienen varios neurotransmisores modulando positiva y/o negativamente la activación de macrófagos y linfocitos los convierte en moléculas sumamente importantes en el curso y la resolución de la respuesta inflamatoria.

1.8.3 MEDIADORES CELULARES.

Son muchas las células que participan en la respuesta inflamatoria, con múltiples y variadas acciones e interacciones con el resto de los mediadores de la inflamación.

Inflamación: Mediadores celulares
Polimorfonucleares
Neutrófilos
Basófilos y mastocitos
Eosinófilos
Plaquetas
Monocitos y macrófagos
Linfocitos
Células B
Células T
Células nulas

Polimorfonucleares neutrófilos: Son células nucleadas que se forman en la medula ósea. En su membrana poseen receptores que se unen a las fracciones del complemento C3b, C3bi y C5a, así como a la porción Fc de las inmunoglobulinas IgG e IgM. De los tres receptores principales para el Fc, los neutrófilos poseen dos, el FcRII y el FcRIII, que muestran alta afinidad para unirse a complejos inmunes Ag-Ac. En la membrana de estas células también se expresan moléculas de adhesión, entre las que se encuentran el CR3, el GMP-140 y LFA-1. Los neutrófilos poseen en su citoplasma dos tipos de gránulos morfológicamente distintos: los primarios o azurófilos y los secundarios o específicos que contienen proteasas. Su principal función es la fagocitosis y la destrucción de los microorganismos, pero participan así mismo de forma activa en múltiples acontecimientos de la inflamación aguda y crónica entre las que cabe citar:

fagocitosis, amplificación del proceso inflamatorio (generación de radicales libres, liberación de proteasas, producción de derivados del ácido araquidónico)

Polimorfonucleares basófilos y mastocitos: Son células nucleares que tiene su origen en la médula ósea. En su citoplasma presentan gránulos basófilos que, ante ciertos estímulos, pueden vaciar su contenido al exterior de la célula. Esto sucede generalmente a través de un mecanismo mediado por el depósito sobre su membrana de complejos inmunes en donde los anticuerpos son IgE. En la inflamación intervienen a través de la acción de sus mediadores; estos son de dos tipos: unos, formados con anterioridad al proceso inflamatorio y que se encuentran almacenados en el interior de los gránulos citoplásmicos (histamina, heparina, etc.), y otros que se forman en el curso de la activación celular (PG, PAF, SRS-A, etc.). Sus principales acciones en la inflamación son: vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular, quimotaxis, activación plaquetaria, modulación de la función de monocitos. Las sustancias que liberan los basófilos salen directamente hacia la sangre, a diferencia de los mediadores pro-inflamatorios que liberan las células cebadas.

Polimorfonucleares eosinófilos: Se originan en la médula ósea. En sus gránulos contienen distintas proteínas. Tienen receptores para las inmunoglobulinas IgG, IgE e IgA. Expresan también receptores para citocinas. Desarrollan un papel primordial en la defensa frente a parásitos. En la inflamación intervienen en: liberación de PAF, liberación de prostaglandinas, leucotrienos y proteínas del complemento, liberación de mediadores por otras células, daño tisular. Su número y su acumulación en los órganos de choque aumenta en el curso de las reacciones inflamatorias de naturaleza alérgica.

Plaquetas: Las plaquetas derivan de los megacariocitos de la médula ósea, son fragmentos celulares anucleados. La activación de las plaquetas en los puntos de inflamación o lesión tisular tienen lugar mediante estímulos como la trombina, el colágeno, los derivados del ácido araquidónico. Las plaquetas participan fundamentalmente en la hemostasis, las respuestas celulares a la agresión y la cicatrización de las heridas. Su función en la inflamación es la hemostasis y la liberación de mediadores (aminas vasoactivas como la serotonina y los derivados del ácido araquidónico como el tromboxano 12-hidroxitetraenoico (12-HETE)), así como factores de la coagulación.

Monocitos y macrófagos: Los monocitos son células que se forman en la médula ósea y tras un paso intermedio por la sangre alcanzan los tejidos donde se convierten en macrófagos. En su membrana expresan múltiples receptores. Secretan múltiples mediadores del proceso inflamatorio: citocinas (IL-1, IL-6 TNF), factores de coagulación (V, VII, IX, X), tromboplastina, inhibidores del activador de plasminógeno y de la plasmina, componentes del complemento, proteasas. Los macrófagos son fundamentales en la respuesta inflamatoria, en la que, además de su importante papel en la liberación de mediadores inflamatorios, son básicos en la presentación de antígenos, secreción de citocinas y modulación de la función de células T y B. Su participación en la inflamación es: actividad fagocítica, amplificación de proceso inflamatorio mediante la liberación de: citocinas, factores de coagulación, componentes del complemento, prostaglandinas y leucotrienos, radicales libres, óxido nítrico, proteasas, modulación de la respuesta inmune, presentación de antígenos y lesión tisular. Pero al mismo tiempo, su función como fagocitos ayuda a la eliminación del tejido dañado o de los microorganismos invasores, lo cual contribuye a la resolución del proceso inflamatorio.

Linfocitos: Son un grupo de células primordiales en el inicio, el desarrollo y el control de la respuesta inmune. Son las únicas células del cuerpo que tienen receptores exclusivos para reconocer antígenos extraños. Por consiguiente, ellos inician las respuestas inflamatorias que suceden a continuación de la penetración al cuerpo de sustancias extrañas. Se distinguen dos tipos de linfocitos: las células B encargadas de la producción de anticuerpos y las células T con importantes implicaciones en la modulación de la respuesta inmunológica de base celular. Dentro de los linfocitos T se distinguen varias subpoblaciones. Unos se denominan “colaboradores” porque llevan a cabo las funciones moduladoras mencionadas y los otros se llaman “citotóxicos” porque pueden provocar la muerte, por lisis o apoptosis, de otras células del cuerpo.

Células B. Son linfocitos que maduran en la médula ósea. Las células B se encuentran en todos los órganos linfoides, particularmente en los centros germinales de los ganglios linfáticos y del bazo y en los folículos linfoides que se acumulan debajo de las mucosas y en las amígdalas. La estructura característica del linfocito B es el receptor de antígenos de superficie (BCR) constituido por una inmunoglobulina de membrana unido a glucoproteínas transmembranales, que tienen la función de transmitir al interior celular la señal recibida. También expresan sobre la membrana receptores Fc y moléculas de clase

II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Las células B responden al estímulo antigénico dividiéndose y diferenciándose en células plasmáticas, las cuales tienen la función de producir anticuerpos. Los linfocitos B también participan en la presentación de ciertos antígenos a las células T colaboradoras.

Células T. Las células T son linfocitos originados en la médula ósea y en el hígado fetal; se desarrollan y diferencian en células T maduras en el timo. En la superficie de estas células aparecen diversas proteínas que marcan los estadios de maduración; la más característica es la del receptor de antígenos de la célula T (TCR) y diversas moléculas como el CD2, que está presente en todos los linfocitos T y participa en la activación antígeno inespecífica y, el CD3, que también está presente en todas las células T. El antígeno CD4 aparece solo en las células T cooperadoras e interactúa con antígenos del CMH de clase II, mientras que el CD8 aparece en las células T citotóxicas e interactúa con antígenos del CMH de clase I. Existen diferentes subpoblaciones de células T.

Células T cooperadoras ("helper"), conocidas también como linfocitos Th. Son linfocitos CD4+ y reconocen antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas y los macrófagos. Pueden dividirse en dos categorías, conocidas como Th1 y Th2, según su capacidad de producción de citocinas diferentes. Las células T_{h1} producen IL-2, interferón- γ , TNF- β y factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF). Estas son citocinas que estimulan la respuesta celular fagocítica particularmente la de los macrófagos. En cambio, las células T_{h2} producen las interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, las cuales favorecen la división y diferenciación de las células B y la producción de anticuerpos. Las dos poblaciones de linfocitos son indispensables para el mantenimiento de la inmunidad. Sin embargo, en algunas ocasiones participan en reacciones de hipersensibilidad caracterizadas por reacciones inflamatorias perjudiciales al cuerpo. Así por ejemplo, las células T_{h1} inducen respuestas de hipersensibilidad retardada, mientras que las células T_{h2} estimulan la diferenciación de células B y la producción de anticuerpos y participan, por lo tanto, en las respuestas de hipersensibilidad inmediata.

Células T citotóxicas. Son células T capaces de destruir células diana infectadas por virus, parásitos y bacterias o células extrañas que han sido transplantadas. La

mayoría son células CD8+ y reconocen antígenos de superficie asociados a moléculas del CMH de clase I.

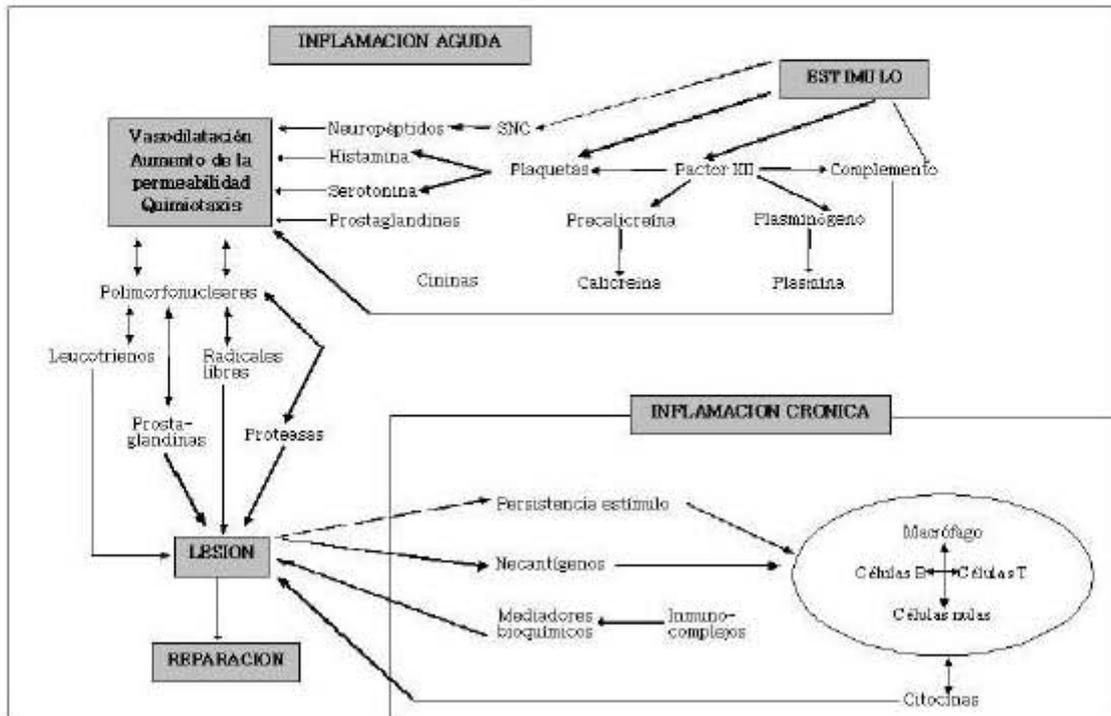
Células T supresoras. Son células T que inhiben o regulan las acciones de otras células T y B. Si bien la mayoría de estas células expresan marcadores CD8+, también pueden expresar otros marcadores. Su existencia ha sido discutida.

Células nulas: Son una subpoblación de linfocitos que no pueden clasificarse claramente como células colaboradoras o citotóxicas. Expresan algunos de los marcadores de los linfocitos T y de las células del sistema mononuclear fagocítico. Tienen una alta proporción de receptores Fc lo que les permite el reconocimiento y destrucción de células diana unidas a anticuerpos. Dentro de esta categoría han sido incluidas las células conocidas como linfocitos granulares gigantes (LGL), las células asesinas (células K) y las células asesinas naturales o NK (natural killer)

Según la localización del tejido dañado o el agente responsable de la lesión, todos los factores humorales y celulares que se han mencionado pueden participar de una manera diferente en las reacciones inflamatorias. Estas variaciones pueden influir para que sea distinta la evolución de la respuesta. Por otra parte, según su duración la inflamación puede ser dividida en aguda o crónica.

1.8.4 INFLAMACIÓN AGUDA.

La inflamación es el proceso de respuesta a una lesión tisular sin importar la causa y precede a la curación del tejido. Es una respuesta inespecífica de un organismo vivo ante un estímulo lesivo o flogógeno, en la que la exudación plasmática y la vasodilatación son intensas, con la consiguiente clínica de tumefacción local, enrojecimiento, aumento de temperatura, dolor e impotencia funcional. Las características de su fase aguda son (1) movilización y activación de leucocitos; (2) vasodilatación regional que permite un flujo sanguíneo mayor en la cercanía del tejido afectado; (3) contracción del músculo liso no vascular y (4) movimiento masivo líquido y constituyentes séricos del compartimiento vascular al tisular en el área inflamada.



Esquema de la participación y acciones de los diferentes mediadores en la inflamación aguda y crónica

(Tomado de Gijón Baños J. *Inflamación y dolor. Conceptos básicos*. Grupo Aula Médica 1997 Pp. 1-18)

En la inflamación aguda se dan una serie de características como son: que el agente desencadenante va a poder ser eliminado, que el neutrófilo es la célula fagocítica predominante, que las lesiones residuales son mínimas y que la respuesta cede al cabo de un lapso corto. Cualquier estímulo capaz de producir una lesión tisular desencadena este tipo de inflamación (antígenos, microorganismos infecciosos, estructuras cristalinas, traumatismos, agentes físico o químicos, complejos inmunes, etc.).

La fase aguda, la cual dura de minutos a varios días, es caracterizada por hemodinamia local y cambios microvasculares, acumulación de leucocitos con adhesión y trasmigración, seguida por la activación y liberación de productos tóxicos. El proceso entero es regulado por una variedad de mediadores derivados de células. Estos eventos son estereotípicos de la inflamación aguda.

En la respuesta inflamatoria aguda se distinguen dos procesos estrechamente relacionados:

- Fase vascular en la que desempeñan un papel fundamental los mediadores bioquímicos como el factor Hageman, los procesos de la coagulación, fibrinólisis y del sistema de las cininas, aminas vasoactivas como histamina y serotonina, la activación del sistema del complemento y de los derivados del ácido araquidónico. La acción de estas sustancias inducen una vasodilatación con mayor aporte de sangre al territorio dañado y un aumento de la permeabilidad vascular.

- Fase celular en la que el polimorfonuclear neutrófilo es el fagocito predominante. En el caso de que la respuesta inflamatoria aguda sea de naturaleza alérgica entonces los polimorfonucleares predominantes son los eosinófilos. Otras células que también pueden participar en esta fase son el basófilo y las plaquetas, que actúan liberando aminas vasoactivas, enzimas proteolíticas y derivados del ácido araquidónico entre otros mediadores. La salida de estas células fuera de los vasos sanguíneos y su migración de hasta el foco inflamatorio está dirigida por diferentes moléculas de adhesión como las selectinas, las mucinas de membrana, las integrinas y diversas moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresadas tanto en las superficies de estas células como en las del endotelio vascular. Una vez que los leucocitos atraviesan el endotelio, su movilización depende de factores quimiotácticos que las ayudan a eliminar, por fagocitosis, el agente lesivo y los detritus del tejido dañado. Tras la eliminación del agente causal, el infiltrado desaparece a la vez que la neoformación de vasos sanguíneos y la síntesis de nueva matriz extracelular por los fibroblastos ayudan a reparar las lesiones tisulares.

1.8.5 INFLAMACIÓN CRÓNICA.

La inflamación crónica es una consecuencia de que el estímulo flogógeno no puede ser eliminado, con lo que el proceso inflamatorio se prolonga. En el curso de la inflamación crónica, la reacción vascular es menos intensa que en la inflamación aguda y, en la fase celular, el monocito y los linfocitos son las células primordiales. La inflamación crónica general tiende a presentar infiltraciones de macrófagos en las áreas afectadas, en ocasiones mixtas, con varios grados de fibroplasia. Cierta hinchazón, dolor y particularmente destrucción tisular acompañan a todas las inflamaciones.

La inflamación crónica dura mucho más tiempo y es menos estereotípica. La infiltración celular esta compuesta primariamente de linfocitos y macrófagos y es acompañada por la proliferación de fibroblastos residentes y el crecimiento de capilares nuevos.

El estímulo inflamatorio persistente, causa de la inflamación crónica, es generalmente una sustancia antigénica (permanencia del antígeno primitivo, autoantígeno o neoantígenos) que desencadena una respuesta inmunológica. Incluso en los casos de inflamación crónica, no inmunológica, la actividad antiinflamatoria puede desnaturalizar proteínas endógenas, provocando la aparición de neoantígenos que ponen en marcha la respuesta inmunitaria. Las infecciones crónicas o las lesiones tisulares irreversibles (en las articulaciones por ejemplo) son causas frecuentes de respuestas inflamatorias prolongadas.

La persistencia de la actividad inflamatoria es la causa de la aparición de lesiones en el tejido sano contiguo, en las que juegan un papel fundamental los macrófagos activados (con la liberación de proteasa, derivados oxigenados tóxicos, agentes quimiotácticos, hidroperóxidos y leucotrienos)

Se puede definir la inflamación crónica como una respuesta celular específica frente al agente agresor, mediada por el sistema inmunológico, por lo que en el infiltrado inflamatorio predominan macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. En cuanto a la respuesta humoral, que también participa en la inflamación crónica, proporciona factores específicos como las inmunoglobulinas y las citocinas, y varios factores inespecíficos (como el sistema complemento) idénticos a los de la inflamación aguda, algunos de los cuales modulan la respuesta inmune. Finalmente, la persistencia de la actividad inflamatoria inevitablemente origina la aparición de lesiones tisulares residuales.

Existen reacciones inflamatorias como la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada, en la cual predominan linfocitos y macrófagos, con una escasa acumulación de neutrófilos.

En la inflamación aguda lo más llamativo es la fase vascular, con la salida de los neutrófilos polimorfonucleares, mientras que en la inflamación crónica el primer plano lo ocupa la respuesta celular.

En resumen tenemos que, la inflamación es un mecanismo fisiológico de protección contra lesiones de tejidos, que restaura el huésped a su estado de salud previo. En situaciones fisiológicas, el estímulo que lesiona tejidos desencadena una serie de fenómenos bioquímicos, inmunológicos y celulares que siguen pasos bastante ordenados, y que culminan en la reparación tisular y la restauración de la función. Una vez terminada la cicatrización, cesa la respuesta inflamatoria hasta que es desencadenada de nuevo. La causa original de la inflamación, en forma directa o por mediadores (como complejos de antígeno-anticuerpo-complemento) desencadena la lesión inicial del tejido. El tejido lesionado libera mediadores que desencadenan los complejos fenómenos celulares y las reacciones bioquímicas que caracterizan la inflamación normal. Por lo general, todos ellos dan como resultado la eliminación de la causa primaria, seguida por curación y recuperación funcional. Sin embargo, en algunos casos, aunque sea posible erradicar la causa original, los diversos mediadores de la inflamación pueden agravar la lesión tisular inicial y amplifican el daño producido por tal causa. Como consecuencia de lo anterior, aparece la inflamación crónica, que generalmente ocasiona signos y síntomas de enfermedad, así como pérdida de alguna función o incapacidad física. A causa del dolor que las acompañan y de las incapacidades que provocan, las reacciones inflamatorias son una causa frecuente de consulta y en su tratamiento o en la reparación de sus secuelas se invierten grandes cantidades de dinero. La industria farmacéutica trabaja en la búsqueda de anti-inflamatorios cada vez más efectivos y con menos efectos colaterales adversos.

1.9. Antiinflamatorios no esteroideos (NSAID).

1.10. Indometacina.

1.9.1 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (NSAID).

Los NSAID forman un conjunto de fármacos anti-inflamatorios que actúan disminuyendo la actividad enzimática de los factores pro-inflamatorios que se forman naturalmente en el cuerpo de todas las personas expuestas a agresiones o que sufren lesiones tisulares. Los NSAID forman un grupo heterogéneo que incluye moléculas aniónicas planares y ácidos débiles, con coeficientes de bipartición lípido/H₂O altos, que se insertan en la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas, de modo que, en presencia de procesos inflamatorios, donde el pH tiende a descender, aumentan su poder de penetración a través de las membranas.

La mayor parte de los NSAID son ácidos orgánicos que, a diferencia del ácido acetilsalicílico, son inhibidores competitivos reversibles de la actividad de las ciclooxigenasas, que son enzimas encargadas de la biosíntesis de las PGs y otros autacoides similares.

Los NSAID incluyen la aspirina, los derivados del ácido propiónico (ibuprofeno, naproxeno, etc.), derivados del ácido acético (como indometacina (Indo)) y ácidos enólicos (como el piroxicam), todos los cuales compiten con el ácido araquidónico en el sitio activo de la ciclooxigenasa.

Al afectar la síntesis de una serie de moléculas que derivan del ácido araquidónico, los NSAID tienen acciones antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas e inhibitorias de la agregación de las plaquetas. Los NSAID disponibles comúnmente vienen de una variedad de clases químicas. Sus propiedades fisicoquímicas determinan su distribución en el cuerpo. Así por ejemplo, los más liposolubles penetran en el SNC más efectivamente y, tal vez, tengan grandes efectos centrales. En la forma de ácidos orgánicos, dichos compuestos casi siempre se absorben adecuadamente después de ser ingeridos, (tienen una biodisponibilidad al 90%) luego se unen ávidamente a las proteínas plasmáticas (tienen una alta afinidad a la albúmina (mas del 95%)) y se excretan por

filtración glomerular o secreción tubular, es decir, por la orina, sin ningún cambio metabólico. Los NSAID son absorbidos casi completamente, tiene baja tasa de depuración y bajo metabolismo de primer paso. La fracción libre del fármaco está usualmente aumentada en pacientes con hipoalbuminemia y tienen pequeños volúmenes de distribución, en su mayoría es inferior a 1. Algunos NSAID son eliminados por la bilis, después de su metabolismo hepático. Por lo general tienden a desplazar a otros fármacos que también se unen a la albúmina.

Los NSAID se dividen en dos grupos con base en su tiempo de vida media (eliminación del plasma y reducción de su concentración a la mitad). Primero los que tienen un tiempo de vida media corta (menos de 6 horas) y, segundo, los que tienen un tiempo de vida media largo (más de 10 horas). Por ejemplo, la Indometacina (Indo) tiene una vida media de 4.6 +/- 0.7 horas, por consiguiente, esta clasificado dentro de los de vida media corta.

Los antiinflamatorios no están sujetos a regulación por la *ley de sustancias controladas* y, por esta razón, los NSAID se utilizan ampliamente para suprimir dolores y molestias menores, cefaleas y el malestar general que acompaña a las enfermedades febriles y los traumatismos, así como para aliviar los síntomas de la fiebre reumática, la osteoartritis, la gota y otros trastornos de las articulaciones y de los músculo esqueléticos. En líneas generales, estos fármacos son los medicamentos de primera elección para el tratamiento de todas aquellas enfermedades caracterizadas por inflamación aguda y/o crónica, lo cual incluye un elevado número de padecimientos, desde la arteriosclerosis hasta la enfermedad de Alzheimer. De allí que sus ventas son enormes y tienden a elevarse cada año más, a pesar de los efectos indeseables que todos ellos tienen.

1.9.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES

Smith y Willis⁸ comprobaron que las concentraciones pequeñas de aspirina e indometacina inhibían la producción enzimática de prostaglandinas. Los antiinflamatorios de esta categoría inhiben la formación de eicosanoides, como los Leucotrienos que también contribuyen a la inflamación.

El mayor mecanismo de acción de NSAID es la inhibición de la actividad de la Cox y por consiguiente, la síntesis de PGs. El rango de orden de potencia de los NSAID's como inhibidores de síntesis de PG *in vitro* tiende a reflejar su potencia antiinflamatoria *in vivo*. Las isoenzimas Cox son el primer blanco para los NSAID's y estos actúan por inhibición de la actividad de Cox-1 y Cox-2; de este modo, bloquean su actividad de convertir el ácido araquidónico a PGG₂.

Se piensa que de la inhibición de Cox-2 dependen las acciones antipirética, analgésica y antiinflamatoria de los NSAID, pero la inhibición simultánea de Cox-1 ocasiona efectos colaterales no deseados, en particular, los que provocan úlceras gástricas, que son consecuencia de la disminución en las síntesis de PGs y TXs.

Los principales efectos terapéuticos de los NSAID son una consecuencia de su propiedad de inhibir la producción de prostaglandinas. La primera enzima en la vía sintética de las PG es la prostaglandina de endoperóxido sintetasa o ciclooxigenasa de ácidos grasos. Esta enzima transforma el ácido araquidónico ((5, 8, 11, 14-ácido eicosatetraenoico), que es un constituyente ubicuo de la membrana celular fosfolipídica, en productos intermediarios inestables, como la PGG₂. Se sabe ahora que hay dos formas de la ciclooxigenasa llamadas ciclooxigenasa-1 (Cox-1) y ciclooxigenasa-2 (Cox-2). La primera es una isoforma constitutiva que aparece en vasos sanguíneos, estómago y riñones, en tanto que la segunda se presenta en situaciones de inflamación por citocinas y mediadores inflamatorios.

Sin embargo, recientemente se ha descrito una tercera isoenzima Cox⁵³: la Ciclooxigenasa-3 (Cox-3) una nueva isoforma de la familia Cox, sensible al acetaminofén, la cual ha sido recientemente clonada a partir de tejido canino. Aparentemente Cox-3 es idéntica a la forma de Cox-1, con la excepción de que el RNAm de Cox-3 retiene el intron 1. Adicionalmente, la expresión del RNAm de Cox-3 es alta en el cerebro.

Kis B. y colaboradores⁵⁰ determinaron la expresión del RNAm de Cox-3 en regiones del SNC de la rata. Los niveles más altos fueron en el plexo y la espina dorsal, en las arterias del cerebro y, dramáticamente más altos en los vasos capilares. También, el RNAm de Cox-3 es expresado en astrocitos, células endoteliales, pero no en las neuronas. Las células endoteliales cerebrales muestran la mayor expresión de Cox-3.

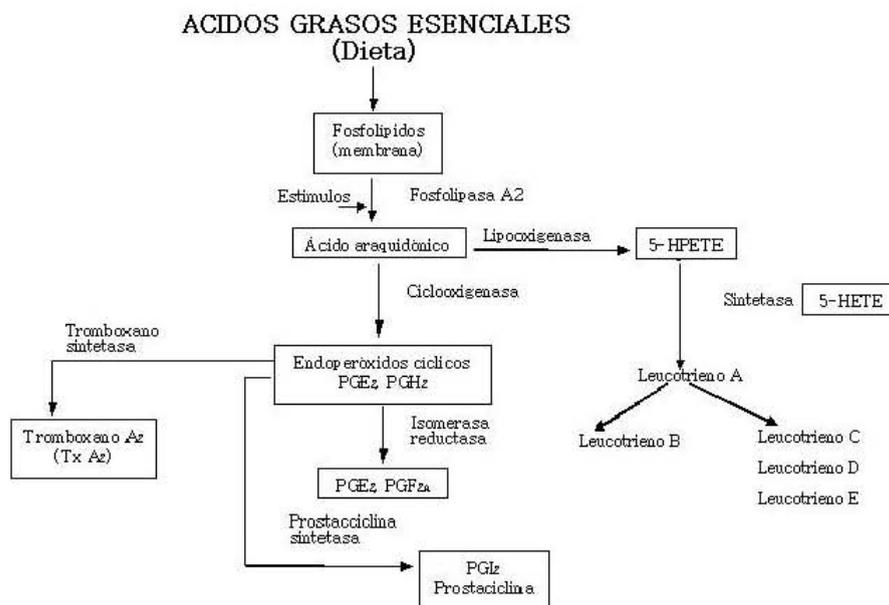
Chandrasekharan y colaboradores⁵¹ describieron la Cox-3 como dos pequeñas proteínas derivadas de Cox-1 (parcial Cox-1 o PCox-1). Cox-3 y una de las proteínas pCox-1 (pCox-1a) es codificada por el mismo gen que Cox-1 pero, a diferencia de COX-1, PCOX-1a retiene el intrón 1 en su RNAm y es un transcrito de aproximadamente 1.9 Kb. Las proteínas pCox-1 adicionalmente contienen una delección de los exones 5-8 del RNAm de Cox-3. Los RNAm de Cox-3 y pCox-1 son expresados en la corteza cerebral canina y, en más pequeñas cantidades, en otros tejidos analizados. En los humanos, el RNAm de Cox-3 es expresado como un transcrito de aproximadamente 5.2 Kb y es más abundante en la corteza cerebral y el corazón. Cox-3 pero no pCox-1a posee actividad ciclooxygenasa dependiente de la glucosilación.

Comparando la actividad de Cox-3 canina con la actividad de Cox-1 y -2 murina se demostró que esta enzima es selectivamente inhibida por drogas analgésicas-antipiréticas como el acetaminofén, fenacetina, antipirina y dipirona y es potencialmente inhibida por algunos NSAID's. Así, la inhibición de Cox-3 podría representar un mecanismo por el cual estos fármacos disminuyen el dolor y posiblemente la fiebre.

Cox-3 es significativamente más sensible a acetaminofén que Cox-1 ó -2 a las más bajas concentraciones de sustrato. El acetaminofén inhibe a Cox-3 con una IC_{50} de 64 μ M. El acetaminofén es considerado el metabolito activo de la fenacetina, un popular fármaco analgésico-antipirético que no es muy usado, ya que la incidencia de la metahemoglobinemia, toxicidad renal y carcinogenesis de vejiga aumenta durante su uso. Sin embargo, la fenacetina es más potente inhibiendo Cox-3 que el acetaminofén. Bajo condiciones de sustrato de 30 μ M, fenacetina inhibe Cox-3 con un IC_{50} de 102 μ M. Otro fármaco analgésico-antipirético, la dipirona, es también significativamente más potente inhibiendo Cox-3 que Cox-1 ó -2. La dipirona inhibe Cox-3 con un IC_{50} de 52 μ M. Cox-3 también difiere en su sensibilidad de inhibición por una selección de NSAID's. El diclofenaco fue el más potente inhibidor de Cox-3; la aspirina, el ibuprofeno y el diclofenaco preferencialmente inhiben Cox-3 sobre Cox-1 y-2.

La biotransformación de los productos de las ciclooxygenasas PGG_2/PGH_2 difiere de un tejido a otro y depende de las actividades enzimáticas metabolizantes de PGG_2/PGH_2 , particularmente de que exista el ácido araquidónico, que también puede ser transformado por medio de la 12-Lipooxigenasa en 12-HPETE y 12- HETE o por medio de

la vía de la 5-Lipooxigenasa en varios Leucotrienos (LTs). Los NSAID inhiben a la enzima Cox y la producción de PGs, pero no suprimen las vías de la Lipooxigenasa ni la formación de LTs.



Papel del ácido araquidónico y de los sistemas enzimáticos especializados en la síntesis de Prostaglandinas (PGE₂, PG F_{2a}, PGI₂), Tromboxano (Tx_{A2}) y Leucotrienos (A, B, C, D, E)

(Tomado de Campos Héctor. *Uso racional de los antiinflamatorios no esteroideos*. Disinimed 1991. Pp. 43-51, 57-65, 97-113, 140-147.)

En virtualmente todos los tejidos que han sido examinados, el ácido araquidónico libre es convertido a prostaglandinas endoperoxidasas inestables (PGE₂, PGH₂) por el sistema ácido graso ciclooxigenasa. Este sistema enzimático es inhibido por aspirina y en general por todos los NSAID. Aunque los productos del ácido araquidónico formado por la vía de la ciclooxigenasa influyen indirectamente en la capacidad de las células fagocíticas para acumularse en los sitios de inflamación, solo los productos formados por la lipooxigenasa exhiben una potente actividad quimiotáctica. Los más potentes factores de quimiotaxis que pueden ser producidos a partir del ácido araquidónico son los Leucotrienos, particularmente el LTB₄

El ácido araquidónico puede también ser metabolizado a una cantidad de productos de la Lipooxigenasa que tienen un importante papel en la respuesta inflamatoria. Un número de NSAID inhiben varias enzimas lipooxigenasas *in vitro* o en animales. Éstos incluyen diclofenaco e Indo, los cuales disminuyen la producción de LTs

y PGs de leucocitos y células sinoviales por estimulación de la reincorporación de ácido araquidónico libre en triglicéridos. No está bien establecido que a pesar de las diferencias con respecto a la potencia específica y mecanismos de acción, casi todas las NSAID usadas clínicamente inhiben la actividad de la Cox. Sin embargo, los NSAID de mayor uso inhiben de manera no selectiva las isoformas de Cox-1 y Cox-2 o poseen pequeña selectividad por la isoforma constitutiva Cox-1.

Las concentraciones de NSAID en fluido sinovial son importantes porque este compartimiento está cerca del sitio de acción más común de los fármacos. Una baja concentración de NSAID en el fluido sinovial es el resultado de una baja concentración de albúmina en el fluido sinovial, comparado con el plasma.

Los estudios sobre la circulación enterohepática de los NSAID son limitados, pero los resultados disponibles sugieren que, al menos en el caso de la Indo y el sundilac, existe una substancial excreción biliar.

Seideman y Melander⁴¹ encontraron que, bajas dosis de Indo y acetaminofén, fueron igual de efectivas que altas dosis de indometacina, en pacientes con artritis reumatoide.

Existe alguna evidencia de que la indometacina es el NSAID más conveniente para el tratamiento de espondilitis anquilosante.

1.9.2 EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS NSAID.

Los mecanismos de defensa gástrica están constituidos por los siguientes elementos:

- a) Barrera mucosa. Es una capa de material viscoso parecido a un gel, que se encuentra entre la mucosa gástrica y el espacio luminal estomacal, jugando un papel importantísimo en la protección del epitelio mucoso. Por debajo de esta barrera mucosa hay una capa de bicarbonato segregada por las células epiteliales. El gradiente amortiguador creado por esta barrera, es responsable del mantenimiento de un pH neutro en la cercanía de la célula epitelial.

- b) Barrera lipídica. Los fosfolípidos se concentran en la superficie luminal del epitelio gástrico, lo cual crea una superficie hidrofóbica que limita en forma significativa la difusión de los iones hidrógeno, del lumen hacia el interior de la célula mucosa. Al dañar la mucosa gástrica, los NSAID van a permitir la difusión de los iones hidrógeno hacia el interior de la célula epitelial, lesionándola.
- c) Flujo sanguíneo mucoso y reposición. El mantenimiento de un flujo sanguíneo adecuado también es importante en la prevención del daño a la mucosa por el medio ácido. Si la barrera mucosa gástrica es lesionada por el ácido, el ión hidrógeno intracelular es removido mediante un aumento compensatorio en el flujo mucoso. La reposición o reconstitución de la mucosa mediante la reepitelización, constituye un importante mecanismo para mantener la integridad de la mucosa gástrica. Sin embargo, si la multiplicación celular falla, puede desarrollarse una erosión que puede evolucionar hacia una úlcera.
- d) Prostaglandinas. Las PGs son componentes vitales para la defensa de la mucosa gástrica. Tienen un efecto inhibitorio de la producción de ácido gástrico; estimulan la secreción del bicarbonato y la síntesis de moco y aumentan el grosor del gel mucoso. La PGE_2 mejora el gradiente de pH del moco entre el lumen y la superficie epitelial. La PGE_2 incrementa la superficie hidrofóbica de la mucosa gástrica, mejora el flujo sanguíneo, protege la mucosa mediante la estimulación del transporte activo de sodio. Obviamente, con todas estas funciones protectoras de las PGs, al ser bloqueadas por los NSAID dejarán el camino expedito para la lesión de la mucosa gástrica. Se puede añadir que las PGs tienen un papel en la modulación del tono vascular y que algunos agentes hipertensivos y diuréticos tal vez estimulan su liberación.

Uno de los principales inconvenientes que tiene la administración de los NSAID es que tienen efectos colaterales, completamente ajenos a su actividad anti-inflamatoria. Debido a que las PGs participan en el mantenimiento de la fisiología normal gastrointestinal, no es sorprendente que los fármacos que inhiben la formación de PGs, como los NSAID, interfieran con las funciones normales del tubo digestivo. La complicación más frecuente que tiene la administración de los NSAID es que facilitan la formación de úlceras gástricas o intestinales, que a veces se acompañan de anemia por

la pérdida hemática resultante. Todos los NSAID pueden provocar dispepsia y exacerbar los síntomas de una úlcera pre-existente. Los individuos que utilizan estos fármacos durante largo tiempo tienen un riesgo relativo tres veces mayor de sufrir efectos gastrointestinales graves, en comparación con quienes no lo usan.

Otra actividad colateral de los NSAID es su efecto sobre el embarazo y el embrión. En animales de experimentación y en mujeres se ha demostrado que los NSAID prolongan el tiempo de la gestación. En humanos se les ha utilizado para prevenir la amenaza de parto prematuro. Las PG de las series E y F son potentes uterotrópicos, y su biosíntesis por parte del útero aumentan en forma extraordinaria horas antes del parto, de tal modo que, administrados en esos momentos o con anterioridad, puede retrasar el momento del parto y reducir los riesgos de la prematuridad.

La inhibición de la síntesis de PGs, debido al bloqueo enzimático de la Cox, representa el mecanismo de acción fundamental de los NSAID. Tal supresión, sin embargo, es responsable de un grupo importante de efectos secundarios. Además de los ya mencionados se puede citar, por ejemplo, que los NSAID impiden que las PGE₂ y PGI₂ lleven a cabo su efecto protector sobre la mucosa gástrica. Normalmente las PGs reducen la secreción ácida y por lo tanto tienen una acción citoprotectora intrínseca sobre la mucosa.

La inhibición de estos mecanismos protectores por bloqueo de la síntesis de PGs, permite explicar las complicaciones gastrointestinales por el uso de NSAID (gastritis, acción ulcerogénica, sangrado). Se sabe, además, que la inhibición de la Cox ocasiona un déficit en la producción del Tromboxano A₂ (TxA₂), el cual es esencial para la fisiología de la agregación plaquetaria. Tal inhibición se traduce, por tanto, en una alteración de la función plaquetaria, la cual clínicamente se expresa por aumento del tiempo de sangrado. La inhibición de la Cox determina un desplazamiento metabólico hacia la vía de la Lipooxigenasa, con lo cual se genera una sobreproducción de LTs y sustancias intermedias. Las PGs adicionalmente participan en la regulación de la tasa de filtración glomerular, flujo plasmático renal y balance hidrolítico Na/H₂O, por tales motivos, la inhibición en la síntesis de PGs puede ejercer efectos adversos, especialmente en pacientes en situaciones de riesgo, como son los individuos deshidratados, los ancianos,

los que reciben diuréticos, o los que sufren de alguna afección renal, produciendo oliguria y edema.

Como ya ha sido mencionado previamente, todos los NSAID pueden producir reacciones secundarias adversas, no solo cuando son administrados en dosis excesivas (lo que constituye un problema de orden toxicológico), sino también como consecuencia de una acción colateral del fármaco.

Los efectos colaterales, relacionados en gran parte con la inhibición de la síntesis de PGs, pueden resumirse como sigue:

1) Efectos gastrointestinales. Se observan más comúnmente en el tracto gastrointestinal superior, donde pueden causar gastritis erosiva, úlcera péptica y sangrado gastrointestinal. La gastropatía por NSAID consiste en eritema, hemorragia de la mucosa y erosiones, con formación de una úlcera en su fase final. El daño de la mucosa gástrica es el efecto adverso más importante de la administración de los NSAID, siendo fundamentalmente la ruptura de la barrera protectora normal del estómago.

2) Efectos antiagregantes. Los NSAID inhiben la formación de TxA_2 mediante el bloqueo de la Cox, actuando de esta manera como antiagregantes plaquetarios. Pueden interferir con la función plaquetaria y causar hemorragias en pacientes que toman anticoagulantes.

3) Efectos renales. En condiciones de desequilibrio hemodinámico, tales como insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis hepática, síndrome nefrótico, etc., la PGE₂ y la prostaciclina desempeñan un papel primordial en el mantenimiento del flujo renal. Ellas participan en la autorregulación de la filtración glomerular y también influyen en el transporte tubular de iones y agua. En esos pacientes, los NSAID pueden inducir insuficiencia renal que, por lo común, es reversible cuando se suspende la administración del fármaco. El agente que más a menudo se asocia a estas reacciones es la Indo. Como la PGE₂ es natriurética, los NSAID pueden retener líquidos al inhibirla y disminuir la excreción de sodio, seguida de hiperpotasemia, oliguria y anuria. Además, los NSAID pueden causar daño reversible de la filtración glomerular, falla renal aguda, edema, nefritis intersticial, falla renal crónica e hipercalcemia.

- 4) Efectos hepáticos. Los NSAID administrados en forma crónica y en dosis altas pueden producir disfunción hepática. Se han informado que provocan elevaciones transitorias de transaminasas en el suero, especialmente de la alanina transferasa.
- 5) Efectos respiratorios. La inhibición de la Cox reduce probablemente las PGs broncodilatadoras que, unida al mantenimiento de la vía de la Lipooxigenasa, genera LTs que producen finalmente episodios de broncoespasmo.
- 6) Efectos obstétricos. No se recomienda la administración de los NSAID en el último mes del embarazo, ya que retrasan el inicio del trabajo de parto, por inhibición de la contracción uterina, aumentan el sangrado en el posparto inmediato, por la acción antiagregante plaquetaria. En el feto provocan un cierre prematuro del conducto arterioso, lo cual compromete la circulación pulmonar fetal.
- 7) Efectos hematológicos. El tratamiento crónico con NSAID conduce a una anemia por deficiencia de hierro, como consecuencia del sangrado gastrointestinal que producen estos medicamentos. Se han informado agranulocitosis y anemia aplásica en pacientes tratados con Indo. Los NSAID interfieren con una variedad de procesos asociados a la membrana incluyendo la actividad de NADPH oxidasa en los neutrófilos y la actividad de la fosfolipasa C en macrófagos. Un número de NSAID s, incluyendo la Indo, inhiben la función de los neutrófilos.

Aunque está claro que los NSAID pueden inhibir funciones de los leucocitos, independientemente de los efectos sobre la biosíntesis de las PGs, el mecanismo por el cual estos influyen sobre las células no ha sido elucidado. Indo por ejemplo, interfiere con la actividad peroxidasa en las plaquetas y además inhibe la conversión de HPETE a 12-HETE.

Los inhibidores de la Lipooxigenasa también han sido encontrados capaces de influenciar en varias funciones de los linfocitos. Se ha observado que algunos productos del ácido araquidónico pueden inhibir funciones de leucocitos *in vitro*. Las PGs también inhiben varias funciones de linfocitos T y B, incluyendo respuesta proliferativa a mitógenos, citotoxicidad y producción de anticuerpos.

Es conocido que los neutrófilos se activan en respuesta a un estímulo inflamatorio. Los neutrófilos son transformados en células excretoras capaces de inducir daño tisular, mediante la producción de una secuencia de eventos, como respuesta a la acción de complejos inmunes, péptidos bacterianos, C5a, lectinas, mediadores lipídicos, etc. La inmediata respuesta del neutrófilo a estos "ligandos", es un incremento de los niveles de calcio en el citosol, la agregación, el ensamble del sistema de aniones superóxido en el plasmalema y la activación de la PKC. La Indo inhibe esta activación de neutrófilos, independientemente del bloqueo de la síntesis de PGs.

En algunos pacientes con artritis reumatoide, el uso de NSAID ejerce un efecto inmunomodulador expresado por una disminución en la circulación periférica de las células T y B activadas.

Las Cox no muestran un papel relevante en las funciones de células T *in vitro*, por eso cuando se utilizan inhibidores de Cox-2 selectivos o no selectivos (NSAID) en pacientes con enfermedades inflamatorias autoinmunes, no se espera que induzcan efectos inmunomodulatorios directos en las células T.

1) Reacciones de hipersensibilidad. Las reacciones de hipersensibilidad pueden observarse a diferentes niveles:

- a) Nivel dérmico. Consisten en erupciones maculares o morbiliformes autolimitadas y reversibles al suspender la terapia.
- b) Nivel neurológico. Puede observarse cefalea y confusión, en el 50% de los pacientes que reciben Indo.
- c) Nivel hematológico.

Productos de la vía ciclooxygenasa del metabolismo del ácido araquidónico indudablemente contribuyen a la aparición de eritemas, a un incremento local en la temperatura y fiebre asociada con muchas formas de inflamación aguda y crónica.

1.9.4 INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS DE LOS NSAID.

Los NSAID inhiben la acción de los diuréticos; esto puede contribuir al agravamiento de la insuficiencia cardiaca y el desarrollo de edema en miembros inferiores. Por esa razón, atenúan el efecto antihipertensivo de los diuréticos, antagonistas de adrenoreceptores beta y del captopril. Estos efectos inhibidores se han demostrado muy claramente con la Indo.

La mayoría de las interacciones de los NSAID son de tipo farmacocinético, conduciendo a una disminución en el porcentaje de absorción, distribución y eliminación de, por lo menos uno de los fármacos con los que interactúan. A continuación se mencionan algunos de estos efectos:

- Interacciones con antihipertensores. La Indo disminuye la acción hipotensora de los bloqueadores beta, la alfametildopa y los diuréticos. Este efecto puede deberse a la acción inhibitoria sobre la prostaglandina vasodilatadora o al moderado efecto sobre la retención de sodio de los NSAID. La Indo también inhibe la acción hipotensora de la hidralazina, prazosin, captopril y las dietas hiposódicas. En cuanto a los diuréticos, el efecto hipotensor de las tiazidas es inhibido por la hdo. El efecto diurético, natriurético e hipotensor de la furosemida está disminuido cuando se administra concomitantemente Indo.
- Interacción con compuestos de litio administrados a personas con enfermedades mentales. La depuración renal de litio (Li) disminuye sustancialmente, lo cual conduce a elevaciones sustanciales de las concentraciones de Li en el plasma y el consiguiente peligro de reacciones tóxicas. Esta interacción puede ocurrir en especial con la Indo.
- Interacciones entre NSAID. En la práctica médica diaria se puede observar cómo, en el manejo terapéutico de un paciente, se combinan dos o más NSAID, buscando un efecto sinérgico antiinflamatorio. La combinación que más se ha estudiado ha sido la aspirina con la hdo, demostrándose una disminución de las concentraciones plasmáticas de Indo.

Todos los NSAID, la indometacina en particular, pueden interferir con el control farmacológico de la hipertensión y la falla cardiaca, en pacientes que reciben antagonistas β -adrenérgicos, diuréticos o inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina. Los NSAID tienen diferencias en sus propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y mecanismo de acción, en suma, en sus propiedades comunes de interferir con la producción de PGs.

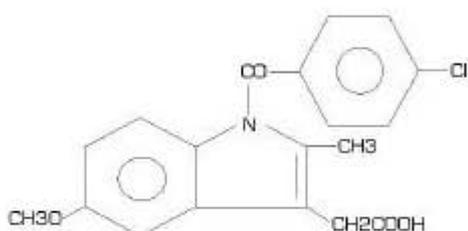
En términos generales, los NSAID brindan únicamente alivio sintomático del dolor y de la inflamación que acompañan a las enfermedades y no detienen la evolución de la lesión patológica de tejidos durante episodios graves.

Además, el uso de NSAID como analgésicos y para alivio de la inflamación aguda y crónica, ha revelado que su administración disminuye la frecuencia de ataques al corazón y ataques fulminantes, probablemente porque interfiere con el desarrollo de la arterioesclerosis, que es una enfermedad inflamatoria crónica de los vasos sanguíneos.

1.9.5 INDOMETACINA (Indo).

La Indo es el producto de los esfuerzos de laboratorios en busca de fármacos con propiedades antiinflamatorias. Fue introducido en el arsenal terapéutico antireumático desde 1963 para tratar artritis reumatoide y trastornos similares. A pesar de que el fármaco se utiliza ampliamente porque es eficaz contra los principales síntomas de la enfermedad, su toxicidad suele limitar su empleo.

Propiedades químicas.



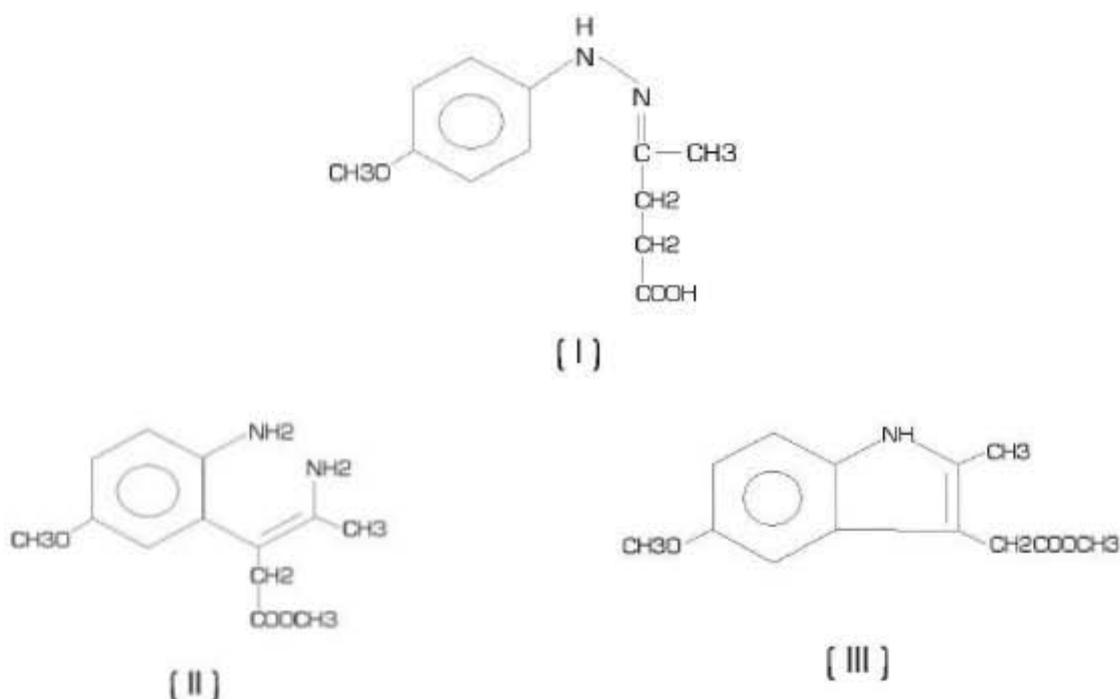
Indometacina

La fórmula estructural de la indometacina, un derivado indólico, metilado es la siguiente:

Ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil, 1H-indol-3-acético; Indocin, Indocin SR. $C_{19}H_{16}ClNO_4$

Preparación

Se forma un compuesto diazo a partir de la p-anisidina y el compuesto de diazonio se reduce con sulfito de sodio. La p-metoxifenilhidrazina resultante se somete a síntesis de índoles de Fisher con levulinato de metilo. Los pasos para seguir incluyen formación de la hidrazona (I), reordenamiento de (I) para dar el compuesto enamina (II), y ciclización de II, a través de la pérdida de amoniaco, a la forma III. A continuación, III se hidroliza a ácido, el cual es reesterificado, vía el anhídrido, para obtener el éster ter-butilo. La acilación con cloruro de p-clorobenzoilo, seguida de desbutilación, da la indometacina.



Descripción.

La Indo es un polvo amarillo pálido a amarillo tostado, cristalino, inodoro o con olor suave; sabor ligeramente amargo; sensible a la luz; estable en el aire y estable al calor, a las condiciones de temperatura ambiente; una forma polimórfica se funde alrededor de 155 °C; la otra alrededor de 162 °C.

Solubilidad.

Un gramo de Indo se disuelve en 50 mL de alcohol, 30 mL de cloroformo ó 40 mL de éter.

Propiedades farmacológicas.

La Indo posee notables propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Los efectos antiinflamatorios de la Indo se manifiestan en sujetos con artritis reumatoide y otros tipos de estas enfermedades que incluyen gota aguda. Es más potente que la aspirina. La Indo posee propiedades analgésicas, diferentes de sus efectos antiinflamatorios y hay datos de que actúa a nivel del sistema nervioso central y del periférico; es también antipirética. Constituye también un potente inhibidor de la Cox que forma PGs, es decir, inhibe la conversión de ácido araquidónico a PGs biológicamente activas, lo cual sugiere que la inhibición del metabolismo del ácido araquidónico cuenta para las actividades antiinflamatorias. También anula la movilidad de los polimorfonucleares, desacopla la fosforilación oxidativa a concentraciones supratrapéuticas y deprime la biosíntesis de los mucopolisacáridos. Es un inhibidor de la fosfodiesterasa, lo cual incrementa los niveles de AMPc, que estabiliza las membranas celulares, incluyendo las lisosomales de los neutrófilos, y disminuye la formación de radicales superóxido. No inhibe la lipooxigenasa.

Farmacocinética y metabolismo.

La Indo se absorbe en forma rápida y casi completa por vías gastrointestinales después de la administración oral. La concentración máxima en plasma se alcanza en término de dos horas en el sujeto en ayuno, pero puede tardar un poco más si el medicamento se ingiere después de las comidas. Después de una dosis oral de 50 mg se alcanza una concentración plasmática máxima de 2.8 µg/mL. No se han valorado en forma definitiva las concentraciones plasmáticas necesarias para lograr efecto antiinflamatorio, pero quizá sean menores de 1 µg/mL. La Indo se une 90% a las proteínas plasmáticas y también lo hace en forma extensa a los tejidos. Su vida media es de 2.6 a 11.2 horas; del 10 al 20% del fármaco se excreta, sin alteración, por orina. En voluntarios sanos se ha descrito un volumen de distribución de 0.6±0.007 L/Kg. La

concentración de hdo en el SNC es baja, pero su nivel en el líquido sinovial es igual a la concentración plasmática dentro del rango de las primeras 5 horas de administración.

La Indo es extensamente metabolizada en el hígado, es decir, es convertida primordialmente en metabolitos inactivos, incluidos aquellos que se forman por O-desmetilación (en promedio, 50%), conjugación con ácido glucorónico (en promedio, 10%) y N-deacilación. Algunos de los metabolitos mencionados son detectables en plasma, y los metabolitos libres y conjugados se eliminan por orina, bilis y heces. Existe recirculación enterohepática de los metabolitos y probablemente de la Indo. La eliminación urinaria de Indo intacta es de aproximadamente un 15%. Se ha descrito una depuración en voluntarios sanos de 2.0 ± 0.4 mL/min/Kg

Interacciones medicamentosas

El alto grado de unión a las proteínas plasmáticas plantea riesgos clínicos al asociar Indo con otros agentes. La presencia de probenecid, (fármaco que se acostumbra utilizar para tratar la gota crónica, por favorecer la eliminación de ácido úrico), aumenta los niveles de Indo y de sus metabolitos en el suero. No interfiere en el efecto \uparrow uricosúrico del probenecid, no modifica los efectos de los anticoagulantes orales, también puede disminuir los efectos antihipertensivos de los diuréticos fásidicos. La asociación con fármacos cumarínicos aumenta el riesgo de sangrado digestivo. La Indo antagoniza los efectos natriuréticos y antihipertensivos de la furosemida; reduce los efectos de los bloqueadores β -adrenergicos y de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. Se ha descrito además, la aparición de la insuficiencia renal por asociación de Indo y triamtereno.

Aplicaciones terapéuticas.

Ante la gran incidencia y gravedad de los efectos colaterales que conlleva la administración de Indo por largo tiempo (INDOCIN), no se le usa a menudo como analgésico o antipirético. Sin embargo, tiene utilidad probada como antipirético en

\uparrow Uricosúrico.- Dicese del agente o droga, como probenecid o sulfpirazona, que aumenta la excreción urinaria de ácido úrico.

algunas situaciones (como en la enfermedad de Hodgking) cuando la fiebre sea rebelde a otros fármacos. Sin embargo, su principal aplicación son sus efectos anti-inflamatorios.

Rhymer y Gengos⁸ revisaron datos de investigaciones con Indo como antiinflamatorio en seres humanos. La mayor parte de tales ensayos mostró que el fármaco reduce el dolor, disminuye la hinchazón y la hipersensibilidad articulares; incrementa la potencia de la presión manual y reduce la duración de la rigidez articular matinal.

La incidencia y la gravedad de los efectos colaterales de la Indo limitan su utilidad terapéutica. Es muy útil para combatir la gota aguda, o en el tratamiento de la artritis. Es de utilidad en el síndrome de Bartter.

La Indo tiene dos usos como mínimo en obstetricia y neonatología. Puede utilizarse como agente tocolítico para suprimir las contracciones uterinas en trabajo de parto pre-término. Además, con la administración del antiinflamatorio es posible controlar la insuficiencia cardiaca en neonatos, causada por la persistencia del conducto arterioso. La limitación principal para tratar neonatos es su toxicidad renal.

Dado que la Cox, controlan la enzima para la producción de PGs, los inhibidores de Cox, de otra manera conocidos como NSAID incrementan la síntesis de TNF. La Indo es un inhibidor de Cox que ha estado por varios años en el mercado, que bien sería recomendada para incrementar los niveles de TNF. Sin embargo, el aumento en la producción de TNF es algo que se debería evitar en los pacientes con artritis reumatoide, en los cuales esta citocina es responsable de una parte importante de las respuestas inflamatorias articulares.

Efectos tóxicos. (Efectos adversos)

Ya mencionados en efectos secundarios de los NSAID.

Indicaciones.

Esta contraindicada en embarazadas y mujeres que amamantan, pacientes con problemas gastrointestinales e individuos alérgicos a la aspirina.

La hdo tiene un lugar bien establecido en el universo de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades reumáticas. Por ejemplo: Osteoartrosis: 50 a 100 mg/día. Artritis reumatoide: 75 a 150 mg/día. Espondilitis anquilosante: 150 mg/día. Gota: hay diversos esquemas de administración, pero uno de los más utilizados es suministrar 200 mg/día de indometacina por dos días, 150 mg/día por los siguientes dos días y continuar con 100 mg/día por los siguientes cuatro días. Reumatismo no articular y lesiones agudas de tejidos blandos: 75 a 100 mg/día.

Otros usos.

Se ha usado para el tratamiento de la dismenorrea, glomerulonefritis, dolor óseo, quemaduras solares, hipercalcemia secundaria a procesos malignos, pericarditis, uveítis y tratamiento de la persistencia del conducto arterioso.

Precauciones.

Debido a la variabilidad y potencial tóxico de la indometacina, se recomienda seguir las siguientes reglas de administración:

- a) Se recomienda administrar la menor dosis efectiva en el control de la sintomatología del paciente. Exceder los 200 mg/día aumentan las reacciones secundarias y no proporciona mayor beneficio terapéutico.
- b) Observar cuidadosamente al paciente y explicarle la naturaleza de la sintomatología que puede presentar.
- c) Las reacciones gastrointestinales pueden reducirse administrándola con los alimentos, inmediatamente después de comer o con antiácidos.
- d) Evitar si es posible en: epilepsia, Parkinson, trastornos psiquiátricos.

1.10. Inflamación, GABA e indometacina.

En el inciso anterior, al revisar los factores que median y/o modulan la respuesta inflamatoria, quedaron claras dos cosas. Una fue que es muy grande la cantidad de factores involucrados en el fenómeno inflamatorio. La otra fue que la inflamación, como una respuesta multifactorial o heterogénea, depende en una buena parte de las interacciones entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino.

Por lo general, toda reacción inflamatoria periférica provoca un aumento en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y la liberación de especies de oxígeno reactivo. Estas sustancias se transportan por la sangre a todos los tejidos del cuerpo y pueden convertir una respuesta inflamatoria periférica o localizada en un evento sistémico. Como una consecuencia, por ejemplo, se modifican la temperatura corporal, el catabolismo, el apetito, la actividad del tejido hematopoyético de la médula, etc.

Directa o indirectamente, las citocinas pro-inflamatorias que se distribuyen por todo el cuerpo también afectan al sistema nervioso central. Cada vez que ocurre una inflamación y se producen las citocinas pro-inflamatorias, las neuronas liberan neurotransmisores en sus terminaciones. Los neurotransmisores liberados pueden ser moléculas excitatorias (como el ácido glutámico, las catecolaminas o la histamina) o inhibitorias (como la glicina, la Ach o el GABA). Estas moléculas influyen sobre la respuesta inflamatoria y pueden modular su evolución⁵³.

La intensidad de la inflamación determina el predominio de una sobre otra respuesta (excitatoria o inhibitoria) y, por supuesto, confirma la naturaleza moduladora de los neurotransmisores. Casi todos ellos pueden tener actividades que algunas veces son pro-inflamatorias, mientras en otros casos resulta todo lo contrario. Las catecolaminas por ejemplo, pueden actuar como pro- y anti-inflamatorios⁵⁴. La respuesta de las neuronas del sistema nervioso ante una reacción inflamatoria implica, no solo el aumento en la producción de neurotransmisores, sino también un aumento en la expresión de sus receptores específicos.

Por otra parte, los efectos del aumento en la producción de los neurotransmisores no solo afectan las neuronas del sistema nervioso central, sino también el sistema neurovegetativo y, particularmente, otras células que no pertenecen al sistema nervioso como los macrófagos y los linfocitos del sistema inmune. Brevemente, se puede citar que el neurotransmisor excitatorio N-metil-D-aspartato (NMDA) estimula los macrófagos y aumenta la producción de las citocinas proinflamatorias como la IL-6⁵⁵ y lo mismo hacen los neurotransmisores conocidos como catecolaminas⁵⁶. En cambio, los neurotransmisores glicina y GABA reducen la producción de las mismas citocinas proinflamatorias^{57, 58}.

Estos efectos periféricos algunas veces tienen relación con la sensibilidad al dolor y otras veces afectan células del sistema inmune. Por ejemplo, después de provocar una reacción inflamatoria prolongada en una pata de un roedor, mediante la inyección de carragenina o de formalina en el cojinete plantar, se ha encontrado que aumenta la expresión de los receptores para los neurotransmisores GABA⁵⁹ y serotonina⁶⁰ en las neuronas de la médula y que este aumento se relaciona con una disminución de la intensidad del dolor que se genera en el área inflamada.

En otros experimentos llevados a cabo sobre animales de laboratorio se ha confirmado el efecto inhibitorio de GABA sobre la inflamación. Durante las respuestas inflamatorias, al aumentar la expresión del receptor para GABA se reduce el dolor de la artritis, aunque no se modifica el curso de la enfermedad⁶¹. Se ha propuesto que el aumento en la expresión del receptor está asociado con un aumento paralelo en la síntesis de los ligandos para el mismo y se ha encontrado que el aumento en la producción de GABA o la inyección experimental del mismo o de sus agonistas, como el muscimol, tiene el mismo efecto analgésico y anti-nociceptivo. Por otro lado, ese mismo tratamiento con muscimol inhibe la respuesta de los linfocitos T y, teóricamente, deprime la síntesis de las citocinas pro-inflamatorias que ellos producen⁶¹.

Un efecto similar ha sido observado después de la administración de algunas BZP que se unen al receptor A para GABA o al receptor periférico de las BZP⁶². WILMS⁶³ opina que el aumento en la producción del GABA disminuye la síntesis de las citocinas inflamatorias, de tal modo que ese aumento se puede considerar un mecanismo que

ayuda a modular negativamente la respuesta inflamatoria en el caso de las enfermedades degenerativas del SNC.

Diferentes productos farmacológicos o no, además de las BZP, pueden actuar como agonistas o antagonistas del receptor para GABA. Aparte de sus actividades sobre el SNC, se puede decir que ellos también influyen sobre la actividad de las células del sistema inmune y sobre las respuestas inflamatorias. Resultados recientes publicados por Reyes⁵⁸ y colaboradores, sugieren que la actividad de los macrófagos (particularmente su capacidad para producir las citocinas inflamatorias) puede ser modificada tanto por el GABA como por sus agonistas y/o antagonistas.

Resulta interesante que los medicamentos que se utilizan en el control de la respuesta inflamatoria, también pueden afectar la respuesta del sistema inmune y la producción de neurotransmisores por el sistema nervioso. Sin embargo, no todos esos efectos son favorables, de modo que algunos de ellos pueden resultar indeseables. Uno de esos medicamentos que tiene efectos colaterales es la Indo, un NSAID del cual ya se ha presentado una breve revisión en los párrafos anteriores.

Es evidente que se pueden relacionar los efectos del neurotransmisor (GABA) que participa como inhibidor en la respuesta inflamatoria y los de la Indo que es un medicamento anti-inflamatorio. Aparentemente, los efectos de GABA e hdo se deben potencializar, pero vamos a comentar enseguida algunos experimentos que muestran un panorama bioquímico un poco más complejo y aún contradictorio. Al revisar la literatura sobre el tema, se van a encontrar razones para justificar el modelo experimental del presente trabajo que estudia el efecto de la indometacina sobre células del sistema inmune que han sido cultivadas en un medio que contiene GABA y/o su antagonista.

La Indo, lo mismo que los antagonistas de GABA anulan la respuesta inhibidora del GABA y el efecto facilitador de la misma que tienen sus agonistas. Por ejemplo, el 3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona (3 α , 5 α THP) es un neuroesteroide sintetizado en el cerebro a partir de la progesterona y que puede unirse al receptor A para GABA. EL 3 α , 5 α THP aumenta la duración de la apertura del canal para iones de cloro y tiene, por lo tanto, una actividad como agonista de ese receptor⁶⁴. En ausencia de GABA, el 3 α , 5 α THP puede actuar como anti-depresivo. Existen otras sustancias, particularmente neurotransmisores

como los agentes serotoninérgicos, que pueden facilitar ese efecto anti-depresivo del 3 α , 5 α THP⁶⁵. Probablemente eso se debe a que aumentan la producción intracerebral del 3 α , 5 α THP y, consiguientemente, aumentan la estimulación del receptor para GABA. Ahora bien, la indometacina anula ese efecto facilitador de los agentes serotoninérgicos⁶⁴ y se comporta como un antagonista del GABA a pesar de su actividad anti-inflamatoria comprobada. Esto puede parecer paradójico porque hemos dicho anteriormente que GABA funciona como un anti-inflamatorio utilizando un mecanismo diferente a la Indo.

Algunos autores⁶⁶ han encontrado que la liberación *in vitro* del GABA por las células del hipotálamo parece depender de las PGs, ya que puede ser bloqueado por la adición de Indo al medio de cultivo. La Indo es un inhibidor de las Cox y reduce la liberación de las PGs. Parece que al faltar las PGs se anula la liberación del GABA y esto podría explicar algunos efectos de la indometacina sobre el sistema nervioso. Otros autores han encontrado que la indometacina reduce la producción de IL-6⁶⁷, la cual es una citocina que otros autores han encontrado estimulante de la producción de GABA⁶⁶ y necesaria para el desarrollo embrionario del cerebro⁶⁸.

Finalmente, como lo señala Raza⁶⁹, GABA puede actuar como un inhibidor de la síntesis de PG y/o antagonizar la respuesta de la PGE₂ en un modelo *in vitro* con el útero de ratas. A concentraciones elevadas (64×10^{-3} M) de GABA se puede observar *in vitro* que el neurotransmisor antagoniza los efectos contráctiles de la PGE₂.

En el presente trabajo, a las células cultivadas en presencia del antagonista del receptor para GABA y con una actividad metabólica reducida y/o estimulada, se les añadieron diferentes cantidades de Indo a concentraciones que reducen la síntesis de las PGs, buscando conocer las condiciones en las cuales la Indo potencializa el efecto inhibitorio del GABA y/o si los antagonistas del receptor para GABA pueden atenuar *in vitro* el efecto de la Indo sobre la actividad metabólica de las células.

2.1 Objetivos e Hipótesis.

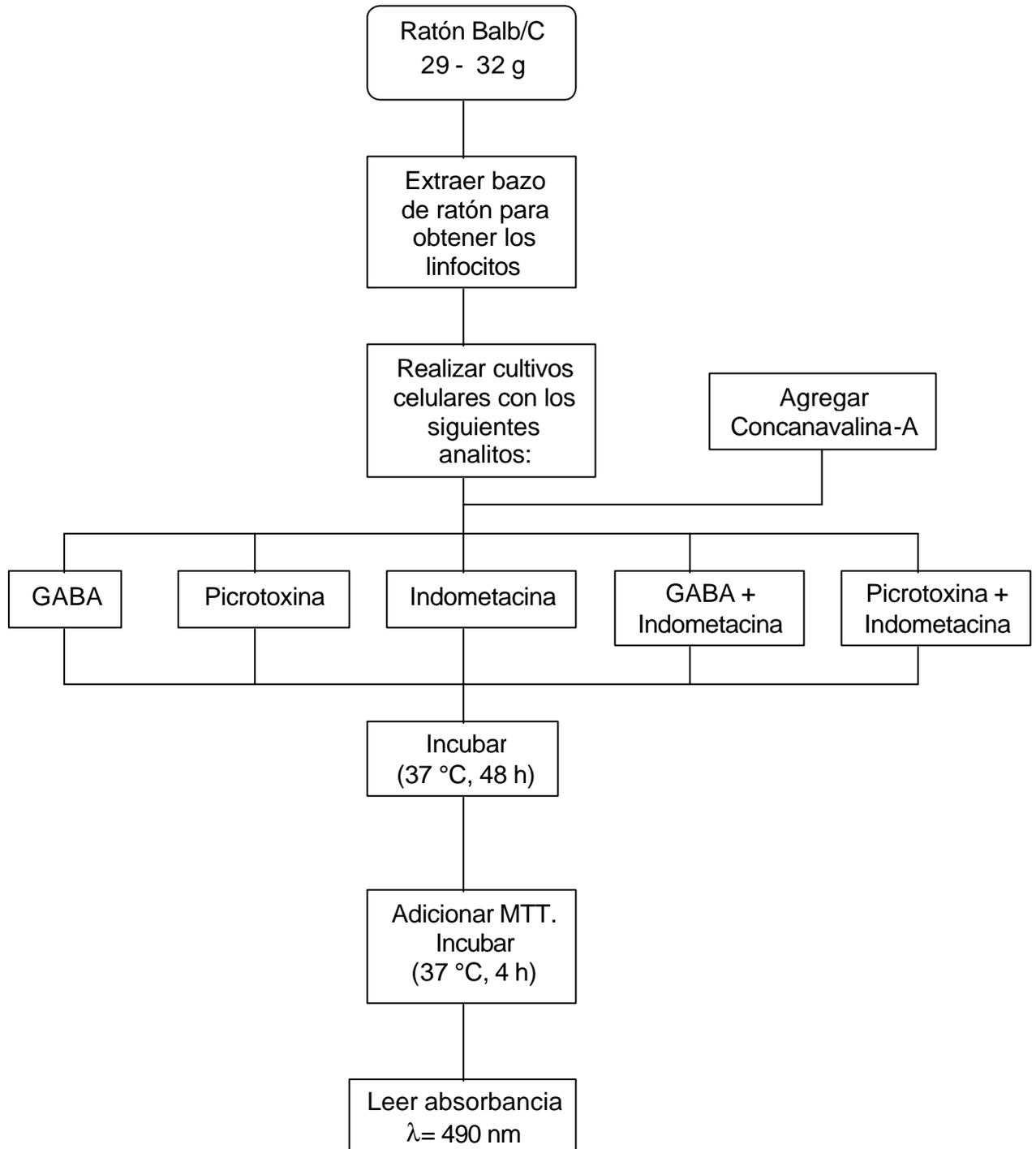
OBJETIVOS.-

- Demostrar que la reducción del MTT es una prueba que permite conocer el grado de actividad metabólica de los linfocitos esplénicos de ratones.
- Conocer las medidas de reducción del MTT por los linfocitos cultivados en condiciones basales y/o en presencia del mitógeno Concanavalina-A.
- Conocer el efecto de GABA y del antagonista de su receptor (Picrotoxina) sobre la actividad metabólica de los linfocitos estimulados con la Con-A.
- Conocer si la Indometacina influye sobre la reducción del MTT por linfocitos que han sido tratados con GABA o con el antagonista de su receptor.

HIPÓTESIS.-

- Si los linfocitos obtenidos de bazo de ratón, presentan el receptor GABA_A, entonces, al agregar GABA al medio de cultivo va a disminuir la actividad metabólica de las células, es decir su capacidad para reducir el MTT.
- Esos mismos linfocitos deben aumentar su actividad metabólica cuando se añade al medio de cultivo el antagonista del receptor para GABA.
- Ya que la Indometacina es un inhibidor de COX y suprime la formación de PGE (que es un inhibidor de la actividad metabólica de las células), su adición al medio de cultivo va a aumentar la reducción del MTT, independientemente de que los linfocitos hayan sido o no tratados con GABA.

3.1 Diagrama de flujo



4.1 Métodos

4.1.1 ANIMALES

Todos los ratones se obtuvieron de Harlan México, a través del bioterio de la Facultad de Química de la UNAM. Se trabajaron con ratones macho BALB/c de peso 27 a 32 g, los cuales se encontraban en excelentes condiciones (libres de bacterias y parásitos) y se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*.

4.1.2 EXTRACCIÓN DEL BAZO.

Se sacrificó al ratón, por dislocación cervical, y en una zona estéril (campana de flujo laminar) se extrajo el bazo del ratón, el cual se colocó en una caja Petri conteniendo 5 mL de solución de Hanks sobre una cama de hielo.

4.1.3 SEPARACIÓN DE LINFOCITOS

Se extrajeron las células con 5 mL de solución de Hanks en una jeringa estéril con aguja fina, se perforó por un extremo y se perfundió el bazo, inyectándole la solución por el otro. Una vez perfundido el bazo, los linfocitos se colectaron en un tubo de centrifuga, el cual estaba previamente en frío, y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 5 mL de solución de Hanks para lavarlos. Esto se realizó 3 veces. Después del último lavado, se resuspendió el botón de células en 1 mL de medio de cultivo RPMI 1640.

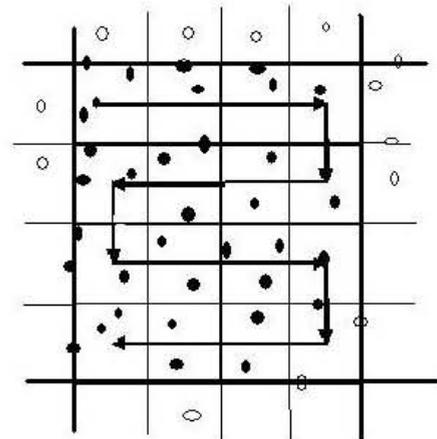
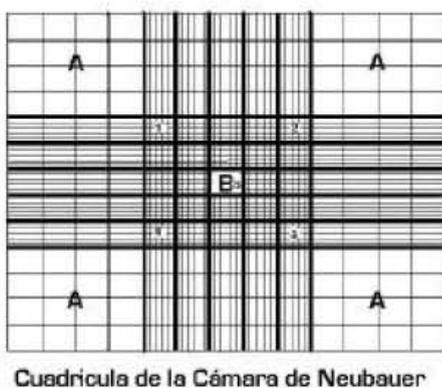
4.1.4 MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR.

De la suspensión celular anterior, se tomaron 20 μL y se agregaron 20 μL de colorante azul tripano en un vial y se mezcló (dilución 1:2). Se tomaron 20 μL de esta dilución y se llenó la cámara de Neubauer (dos cuadrículas). Se contaron las células mononucleares que no estaban teñidas y las que sí se teñieron por el colorante que se encontraban en el cuadro central de la cámara de Neubauer para conocer la cantidad de células viables en la suspensión y trabajar con una viabilidad del 90 – 95%.

Para contar las células, se colocó la cámara en el microscopio y con el objetivo de 40x se enfocó en la zona cuadrículada. La cámara de Neubauer esta dividida en 9 cuadros, cada uno de 1 mm por cada lado. Los cuadros de las 4 esquinas (A) están subdivididos en 16 cuadros más pequeños, mientras que el cuadro central (B) esta subdividido en 25 cuadros más pequeños.

Se enfocó el área central (B) y se contó el número de células viables en 5 de sus 25 cuadros, específicamente, se contaron las células presentes en las 4 esquinas y el centro.

Para contar las células (círculos negros) se siguió el siguiente orden y se contaron los linfocitos INCLUYENDO los que quedaban sobre las líneas de los bordes superiores e izquierdos de cada cuadro (ver círculos negros) pero no las que se encuentran en el borde inferior y derecho.



4.1.5 AJUSTE CELULAR

Después de contar las células y ver su viabilidad, se ajustó su concentración a 3×10^6 células viables/mL con medio de cultivo RPMI 1640. Luego, de cada ratón se sembraron 0.1 mL de su suspensión de linfocitos (300,000 células viables/pozo) en la placa de microcultivo, poniéndose 3 pozos para las células que se encontraron un condiciones basales, así como los pozos por triplicado necesarios para las células en presencia del mitógeno (Con-A) más cada una de los fármacos a estudiar (GABA, PTX o Indo). Inmediatamente se añadieron 20 μ L de la solución de 5 μ g/ml de Con-A/pozo a las

células que se estimularían y se homogenizó adecuadamente cada suspensión celular, evitando la formación de burbujas.

4.1.6 CULTIVO DE LINFOCITOS.

a. En presencia de PTX

Se adicionó a los pozos sembrados con linfocitos esplénicos y estimulados con Con-A (5 mg/mL) las siguientes concentraciones de PTX:

Dilución y concentración PTX	Concentración (pg)	Volumen (mL)
1:500 500 pg/ μ L	200 pg	1 μ L
	250 pg	1.25 μ L
	500 pg	2.5 μ L
	750 pg	3.75 μ L
1:100; 1 ng/ μ L = 1000 pg/ μ L	1000 pg	1 μ L
1:10 10 ng/ μ L = 10 000 pg/ μ L	10 000 pg	1 μ L
	20 000 pg	2 μ L
	40 000 pg	4 μ L
	80 000 pg	8 μ L
STOCK 100 μ g /mL	100 000 pg	1 μ L

b. En presencia de GABA

Se adicionó a los pozos sembrados con linfocitos esplénicos y estimulados con Concanavalina-A (5 mg/mL) las siguientes concentraciones de GABA:

Concentración GABA	Volumen (mL)
0.062 mM	10 μ L
0.125 mM	10 μ L
0.25 mM	10 μ L
0.5 mM	10 μ L
1 mM	10 μ L
2 mM	10 μ L

c. En presencia de Indo

Se adicionó a los pozos conteniendo los linfocitos del bazo y estimulados con Con-A las siguientes concentraciones de Indo:

Concentración Indo	Volumen (mL)	Concentración Final mmol
2 nM	1 μ L	0.002 μ mol
20 nM	1 μ L	0.02 μ mol
2 μ M	1 μ L	0.2 μ mol
	1 μ L	2 μ mol

d. En presencia de GABA e Indo.

Para este caso, se utilizó como constante la concentración de GABA que dio la mayor respuesta inhibitoria en los linfocitos y se le añadió indometacina, según el esquema de administración usado para la Indometacina.

e. En presencia de PTXe Indo.

Para este caso, se utilizó como constante la concentración de Picrotoxina que dió la mayor respuesta estimulatoria en los linfocitos y se le añadió indometacina, según el esquema de Indometacina.

- Para todos los casos, se realizaron los esquemas por triplicado y se homogeneizó adecuadamente para evitar la formación de burbujas.
- Además de que se dejaron pozos para realizar viabilidad de cada uno de los analitos (PTX, GABA, Indo, Con-A) y para viabilidad inicial y final.
- Así como pozos con PTX, GABA e Indo SIN Con-A, también por triplicado.
- Y se incubó la placa a 37°C durante 48 horas.

Ejemplo de una microplaca para el cultivo de linfocitos:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
B	×	×	×	×	×	×	×	×	☆	☆	☆	☆
C	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	⊖	⊖	⊖	⊖
D	⊕	⊕	⊕	⊕	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
E	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	Vi	Vf		
F	VP1	VP2	VP3	VP4	VPc	VG1	VG2	VG3	VG4	VG5	VG6	VGc
G	VI1	VI2	VI3	VI4	VCon							
H												

- × Picrotoxina A1-B8
- ☆ GABA B9-C8
- ⊖ Indometacina C9-D4
- ↗ GABA + Indometacina D5-D12
- ↗ Picrotoxina + Indometacina E1-E8
- Vi: Viabilidad inicial
- Vf: Viabilidad final
- VP1-4: Viabilidad de picrotoxina
- VPc: Viabilidad de picrotoxina cte.
- VG1-6: Viabilidad de GABA
- VGc: Viabilidad de GABA cte.
- VI1-4: Viabilidad de Indometacina
- VCon: Viabilidad de Concanavalina-A

4.1.7 REDUCCIÓN DEL MTT.

Después de las 48 horas, se revisó que los cultivos de los linfocitos estuvieran bien y sin contaminarse (observando la microplaca en un microscopio invertido) y después, en una zona estéril (campana de flujo laminar), se agregó 12 μL de solución de MTT a cada pozo, EXCEPTO los pozos que se consideraron para la viabilidad y se homogeneizó adecuadamente, evitando formación de burbujas. Las placas de microcultivo se dejaron incubando por 4 horas más a 37°C.

Después de estas 4 horas, se revisó que los linfocitos hubieran proliferado y reducido el MTT (observando la microplaca en un microscopio invertido) y enseguida se solubilizaron los cristales de formazán con 100 μL /pozo de solución de lisis, EXCEPTO en los pozos que se consideraron para medir la viabilidad. Se homogeneizó adecuadamente, evitando lo más posible la formación de burbujas. Después, cada placa de microcultivo se dejó en reposo durante 30 minutos y posteriormente, se realizó la lectura espectrofotométrica de la cantidad de MTT reducido a una longitud de onda de 490 nm, en un lector de ELISA.

4.1.8 VIABILIDAD FINAL

Al concluirse las 4 horas necesarias para la reducción del MTT se cuantificó la viabilidad celular en los pozos considerados para cada uno de los analitos, así como la viabilidad final de las células en condiciones basales.

5. Resultados.

5.1 VIABILIDAD CELULAR

Para todas las determinaciones de la viabilidad celular con cada una de las sustancias empleadas en este trabajo (Con-A, PTX, Indo y GABA) se utilizaron linfocitos provenientes del bazo de ratones, manteniendo una concentración constante de 3×10^5 células/pozo. Se evaluó la viabilidad al inicio del experimento (0 horas) y al final del mismo (51 horas), contando en la cámara de Neubauer las células que excluyeron el colorante supravital Azul tripano.

5.1.1 CULTIVOS DE LINFOCITOS CON CON-A

Se determinó la viabilidad de los linfocitos del bazo cultivados en presencia de diferentes concentraciones de Concanavalina-A; en la tabla siguiente se muestran los valores promedio obtenidos al terminar su tiempo de incubación en presencia del mitógeno.

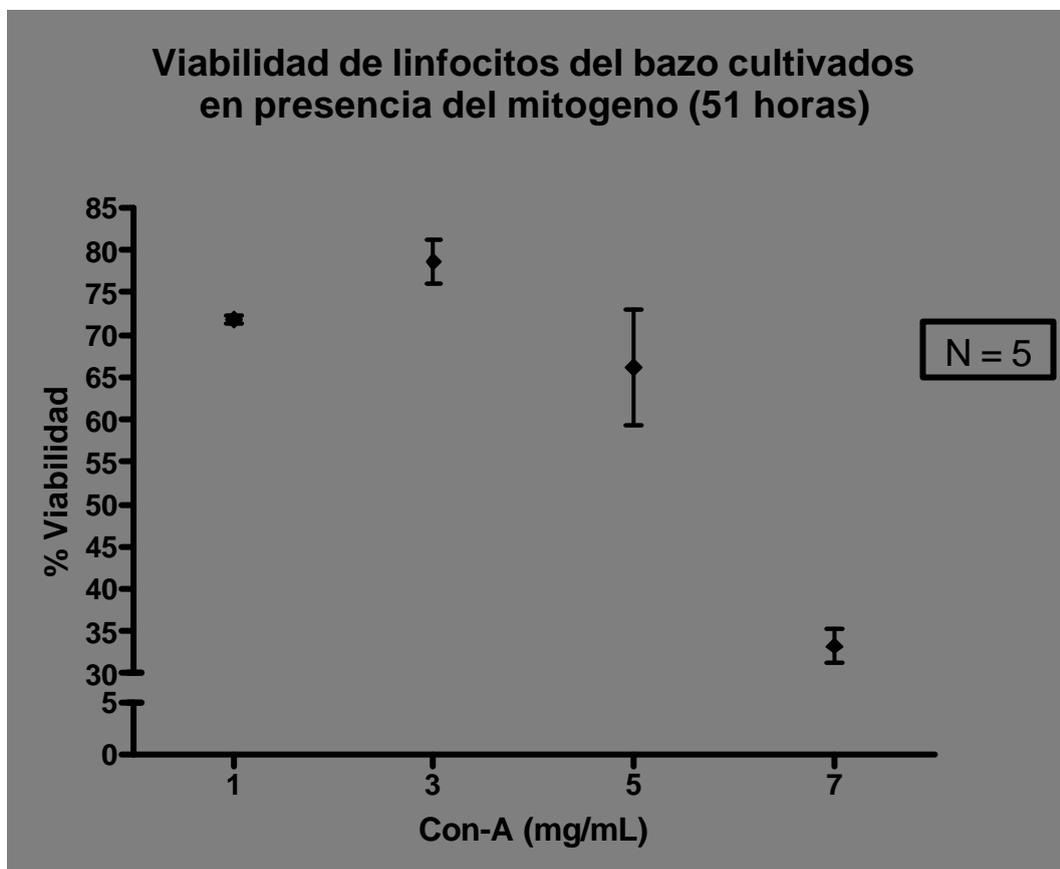
La viabilidad inicial (0 horas) fue del 93.3% mientras que la viabilidad final (51 horas) fue de 62.5%

Tabla 1 Valores promedio de la viabilidad de los linfocitos cultivados con Con-A

Con-A/NaCl 6M (mg/mL)	% Cél. Viables
1	71.8
3	78.6
5	66.2
7	33.3

La figura 1 es una representación gráfica de estos mismos valores.

FIGURA 1.



A mayor concentración de Con-A, menor es la viabilidad. La mejor concentración de Con-a para estimular los linfocitos del bazo *in vitro* es 3 μ g/mL

5.1.2 CULTIVOS DE LINFOCITOS CON PICROTOXINA

Se determinó la viabilidad de los linfocitos del bazo cultivados en presencia de diferentes concentraciones de PTX; en la tabla siguiente se muestran los valores promedio obtenidos al terminar su tiempo de incubación.

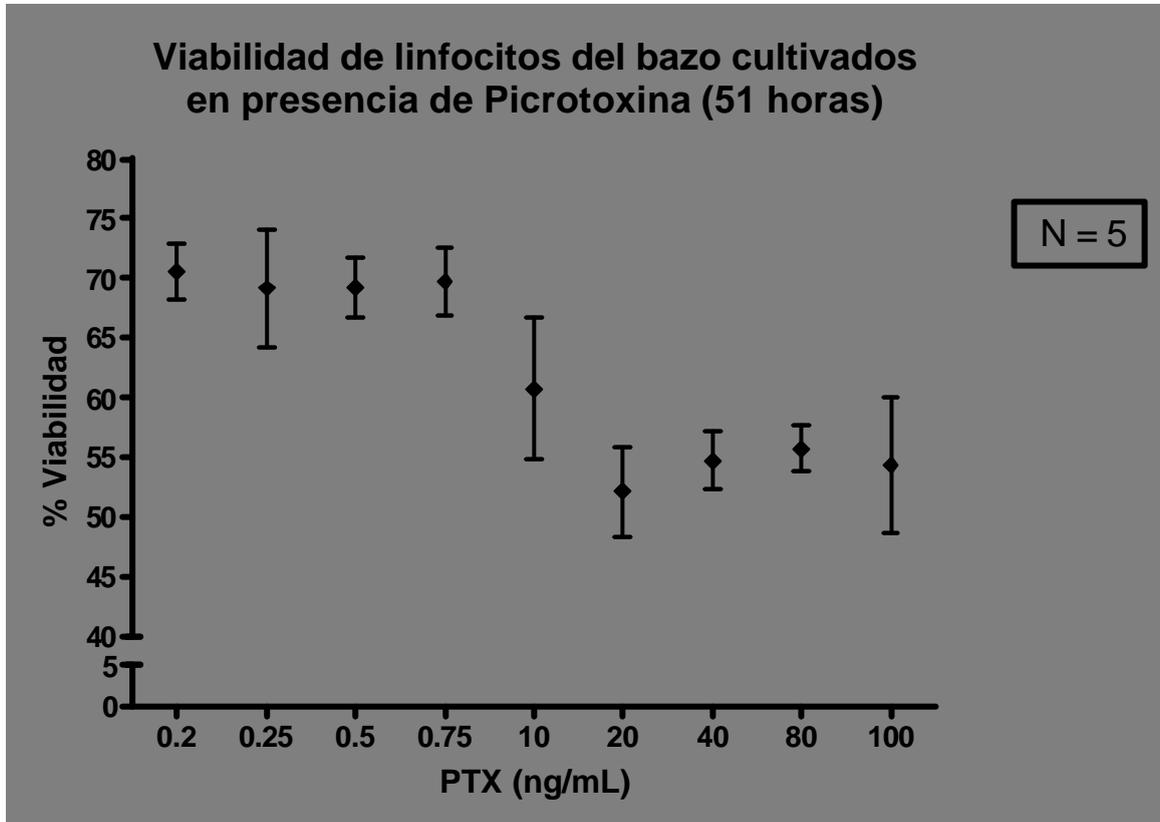
La viabilidad inicial (0 horas) fue del 98.4% mientras que la viabilidad final (51 horas) fue de 66.9%.

Tabla 2. Valores promedio de la viabilidad de los linfocitos tratados con PTX

PTX (ng/mL)	% Cél. Viables
0.2	70.7
0.25	71.4
0.5	72.7
0.75	71.0
10	60.7
20	52.1
40	44.7
80	55.7
100	59.3

La figura 2 es una representación gráfica de estos mismos valores.

FIGURA 2.



Se inició con una viabilidad del 98.4%. En todas las concentraciones de Picrotoxina se mantiene una viabilidad del 50-70% al final del experimento. Dosis bajas, de menos de 1 ng/mL son las que producen los porcentajes más altos de viabilidad en el cultivo de los linfocitos del bazo.

5.1.3 CULTIVOS DE LINFOCITOS CON GABA

Se determinó la viabilidad de los linfocitos del bazo cultivados en presencia de diferentes concentraciones de GABA; en la tabla siguiente se muestran los valores promedio obtenidos al final del experimento

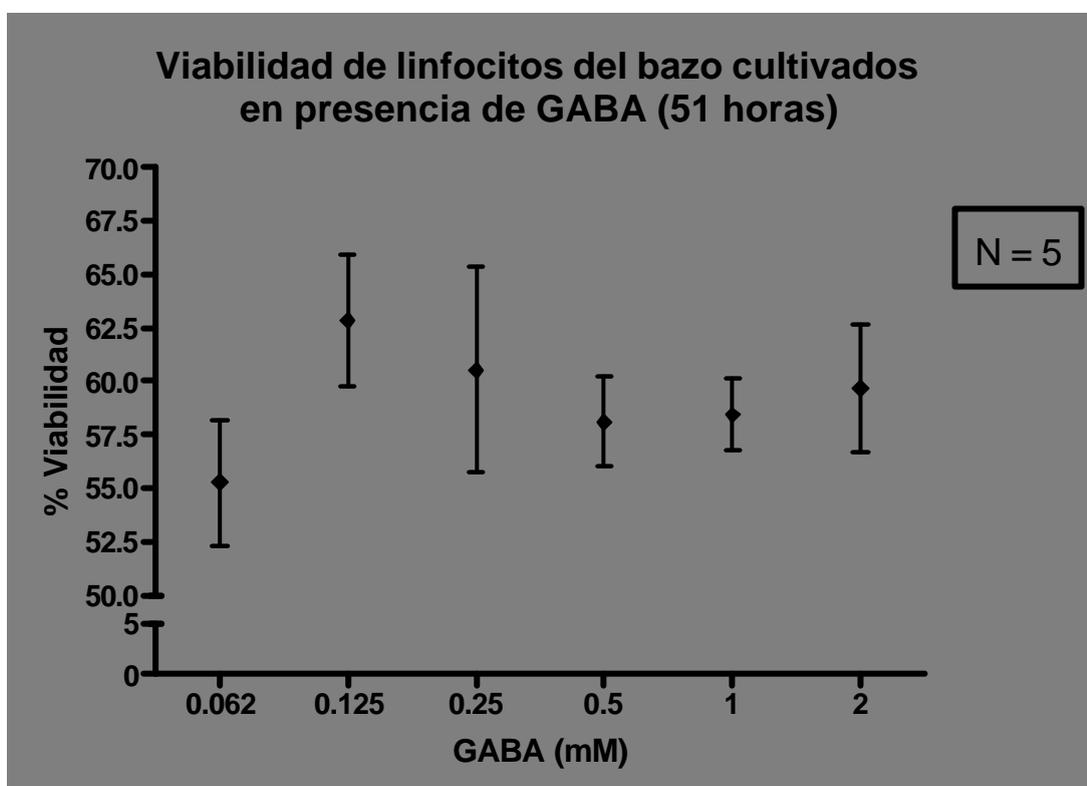
La viabilidad inicial (0 horas) fue del 98.4% mientras que la viabilidad final (51 horas) fue de 57.4%.

Tabla 3 Viabilidad celular promedio de los linfocitos cultivados en presencia de GABA

GABA (mM)	% Cél. Viables
0.062	56.1
0.125	65.3
0.25	62.9
0.5	55.1
1	61.1
2	58.4

La figura 3 es una representación gráfica de estos mismos valores.

FIGURA 3.



Al comienzo del experimento se tenía una viabilidad del 98.4%. En todas las concentraciones de GABA utilizadas (0.062-2 mM) se mantiene una viabilidad del 55-65% al final del experimento, por lo que se puede decir que el GABA a las concentraciones trabajadas no es tóxico para las células.

La viabilidad de los linfocitos del bazo cultivados en presencia de GABA, presentó los valores más bajos, en comparación con las otras sustancias probadas (Con-A, PTX e Indo).

5.1.3 CULTIVOS DE LINFOCITOS CON INDOMETACINA

También se determinó la viabilidad de los linfocitos del bazo cultivados en presencia de diferentes concentraciones de Indo; en la tabla siguiente se muestran los valores promedio obtenidos al terminar su tiempo de cultivo.

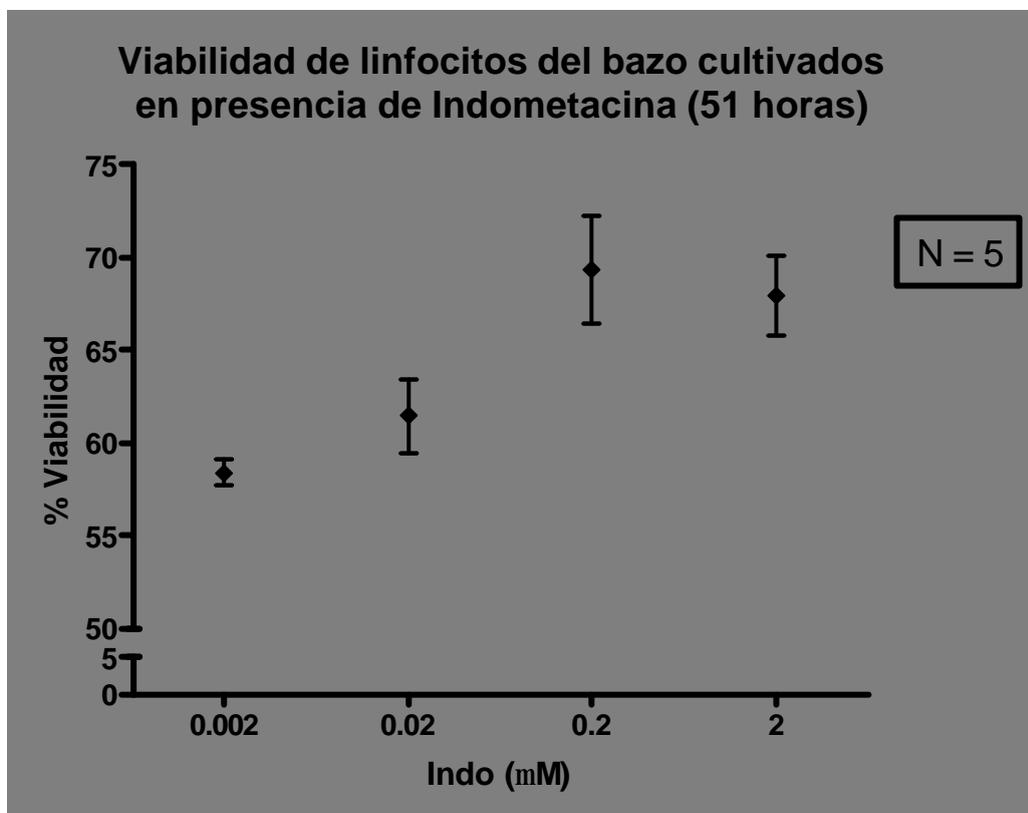
La viabilidad inicial (0 horas) fue del 98.4% mientras que la viabilidad final (51 horas) fue de 69.9%.

Tabla 4. Valores promedio de viabilidad de linfocitos del bazo cultivados en presencia de Indo

Indo (mM)	% Cél. Viables
0.002	58.4
0.02	69.9
0.2	70.0
2	67.9

La figura 4 es una representación gráfica de estos mismos valores.

FIGURA 4.



La viabilidad inicial fue de 98.4%. En todas las concentraciones de indometacina (0.002-0.2 μmol) se mantiene una viabilidad del 58-70% al final del experimento (51 horas). La dosis de 0.2 μmol es la que mejor mantiene la viabilidad de los linfocitos con un valor del 70%, comparable al efecto que ejerce la PTX.

5.2 REDUCCION DE MTT *IN VITRO*

Para todos los experimentos se utilizaron linfocitos provenientes del bazo de ratón, manteniendo una cantidad constante de células (3×10^5 por pozo). La prueba se hizo por triplicado y la microplaca se leyó a 490 nm después de haberlas incubado en presencia de MTT durante 3 horas. Esta determinación permite cuantificar cambios en el metabolismo de las células cuando se tratan con cualquier fármaco y, junto con la viabilidad celular, estima su citotoxicidad.

5.2.1 TRATAMIENTO DE LOS LINFOCITOS *IN VITRO* CON CON-A

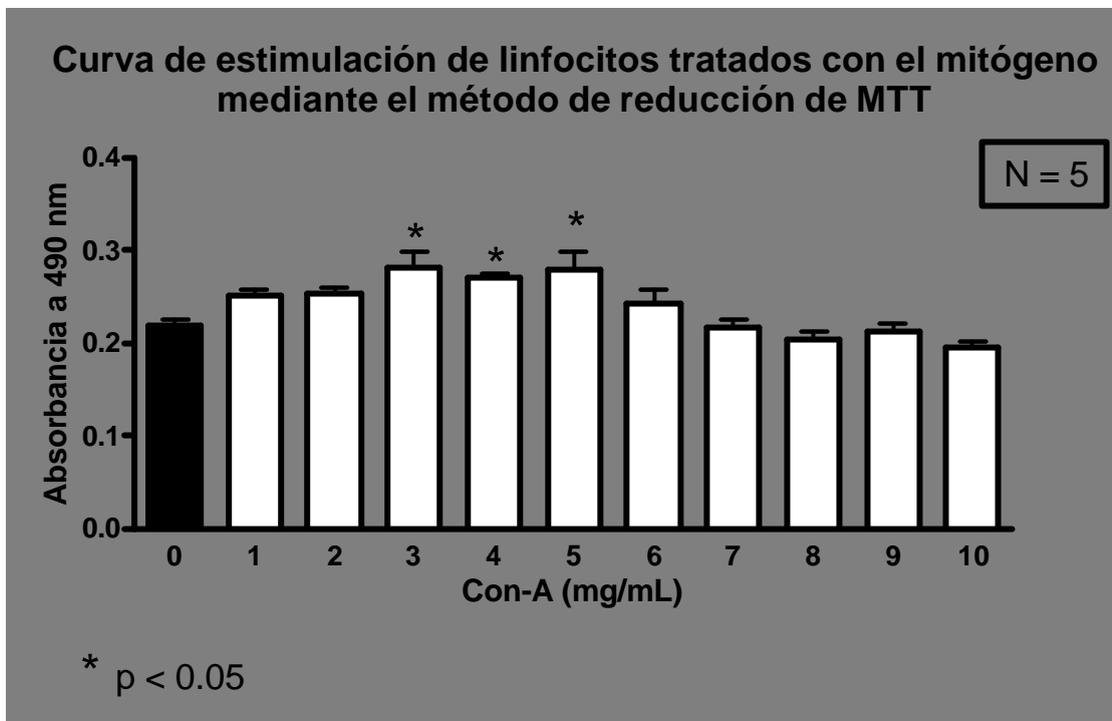
Se realizó esta curva de Con-A para conocer la dosis óptima que estimula a los linfocitos obtenidos del bazo antes de someterlos a cada tratamiento, ya que los linfocitos no estimulados presentan una respuesta menor a cualquier estímulo.

En la siguiente tabla se muestran los valores promedio obtenidos de la reducción de MTT en los linfocitos del bazo tratados con diferentes dosis de Con-A al terminar su cultivo por 51 horas.

Con A (mg/mL)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Promedio Abs	0.219	0.2503	0.2528	0.2805	0.2713	0.2788	0.2418	0.2175	0.2045	0.2123	0.194
Desviación estándar	0.01046	0.01436	0.01218	0.03601	0.008057	0.04097	0.02958	0.0167	0.01666	0.01817	0.01671
Error estándar	0.005228	0.007181	0.006088	0.01801	0.004029	0.02049	0.01479	0.008352	0.008332	0.009086	0.008357

La figura 5 es una representación gráfica de estos mismos valores

FIGURA 5.



El uso del mitógeno Con-A es estimular de manera inespecífica una gran cantidad de linfocitos, después de lo cual se les puede adicionar cualquier otro fármaco y así se amplifica la respuesta de estas células del sistema inmune.

Esta curva se realizó para encontrar la dosis óptima del mitógeno necesaria para estimular los linfocitos, probándose 10 concentraciones diferentes de Con-A (desde 1 hasta 10 mg/mL). De acuerdo a esta gráfica, las dosis útiles de Con-A son de 3 mg/mL y 5 mg/mL.

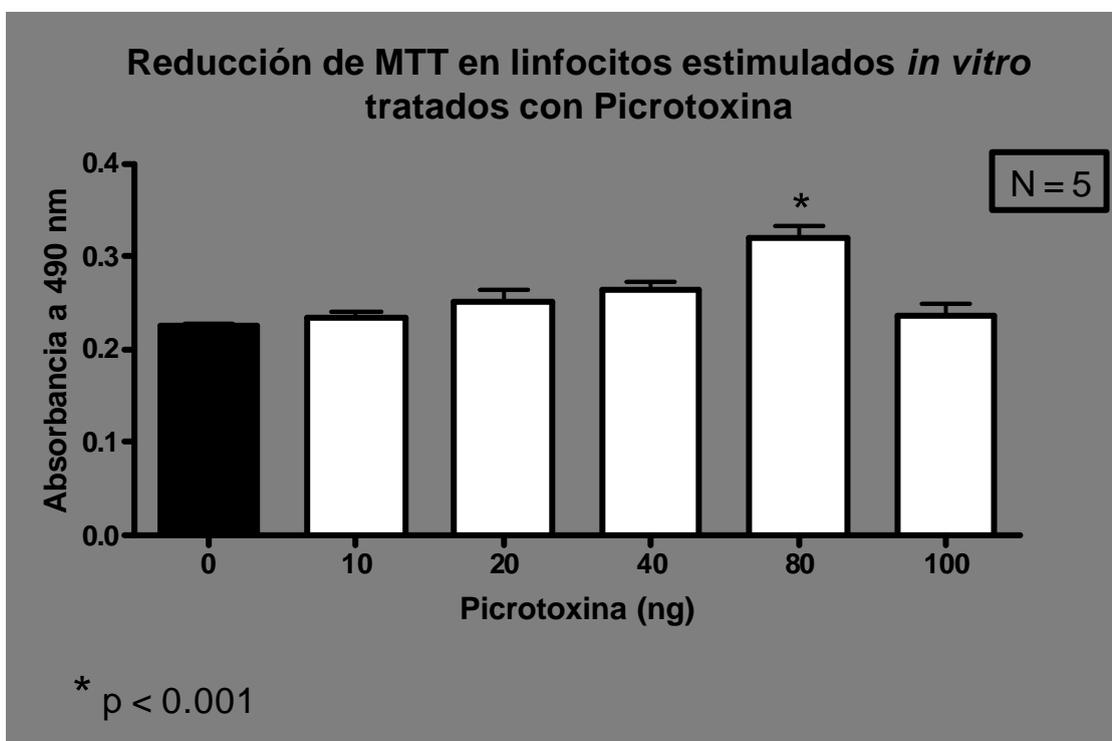
5.2.2 TRATAMIENTO DE LOS LINFOCITOS *IN VITRO* CON PTX

En la tabla siguiente se muestran los valores promedio obtenidos de la reducción de MTT de los linfocitos del bazo estimulados *in vitro* con diferentes dosis de PTX más 5 mg/mL de Con-A, al terminar su cultivo por 51 horas.

PTX (ng)	0	10	20	40	80	100
Promedio Abs.	0.2261	0.2328	0.2506	0.2638	0.3199	0.2356
Desviación estándar	0.007937	0.02408	0.04066	0.03102	0.03877	0.04117
Error estándar	0.00251	0.007615	0.01286	0.009808	0.01226	0.01302

La figura 6 es una representación gráfica de estos mismos valores.

FIGURA 6.



En la gráfica se observa un efecto dosis respuesta directo. Sin embargo, vemos una concentración donde tenemos una reducción máxima (80 ng) para nuestras condiciones experimentales. Este resultado se esperaba porque en una tesis anterior⁸⁵ se encontró que la PTX tendía a incrementar la reducción del MTT en linfocitos no estimulados con el mitógeno Con-A. Además estas, células poseen el receptor GABA_A⁸⁴ por lo que faltaba saber que efecto tendría la PTX en los linfocitos estimulados.

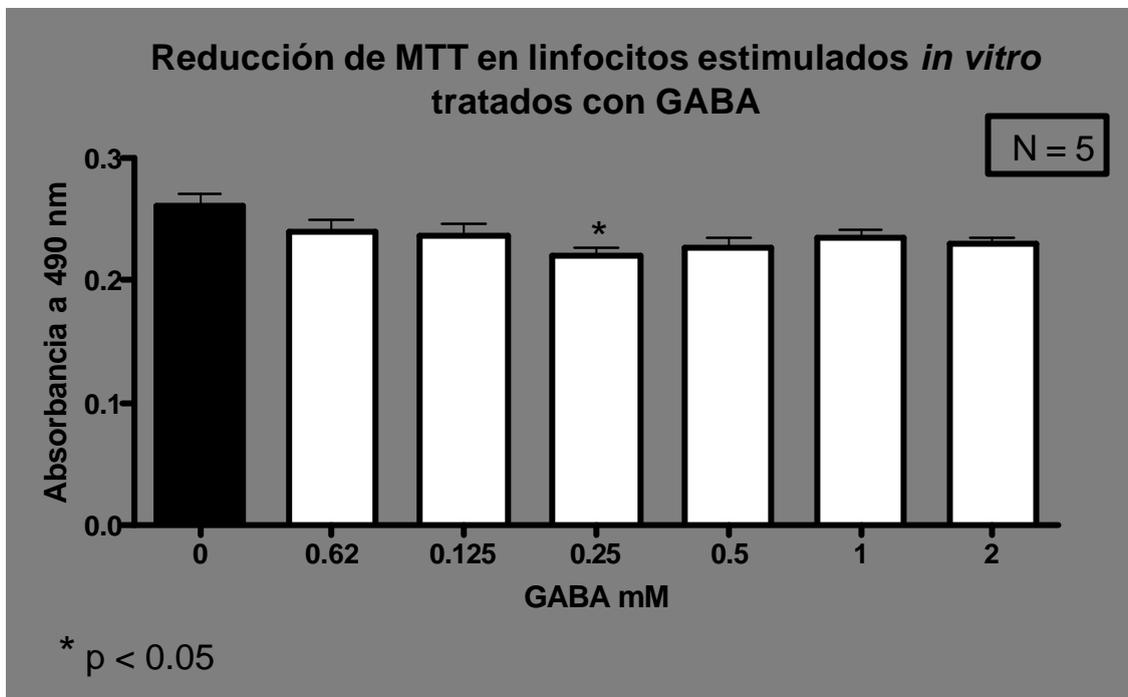
5.2.3 TRATAMIENTO DE LOS LINFOCITOS *IN VITRO* CON GABA

En la siguiente tabla se muestran los valores promedio obtenidos de la reducción de MTT de los linfocitos del bazo tratados con GABA más 5 mg/mL de Con-A, al terminar su cultivo por 51 horas.

GABA (mM)	0	0.62	0.125	0.25	0.5	1	2
Promedio Abs.	0.2605	0.2397	0.2368	0.2201	0.2269	0.235	0.2303
Desviación estándar	0.03137	0.03079	0.0298	0.02278	0.02248	0.02247	0.01602
Error estándar	0.009919	0.009738	0.009424	0.007203	0.007109	0.007106	0.005066

La figura 7 es una representación gráfica de estos mismos valores.

FIGURA 7.



En la gráfica se observa que conforme aumenta la concentración de GABA disminuye la respuesta metabólica de los linfocitos, al contrario de lo que sucedió cuando a los linfocitos se les cultivo con la PTX, un antagonista del receptor A para GABA. La dosis de GABA que más redujo la actividad metabólica fue 0.25 mM.

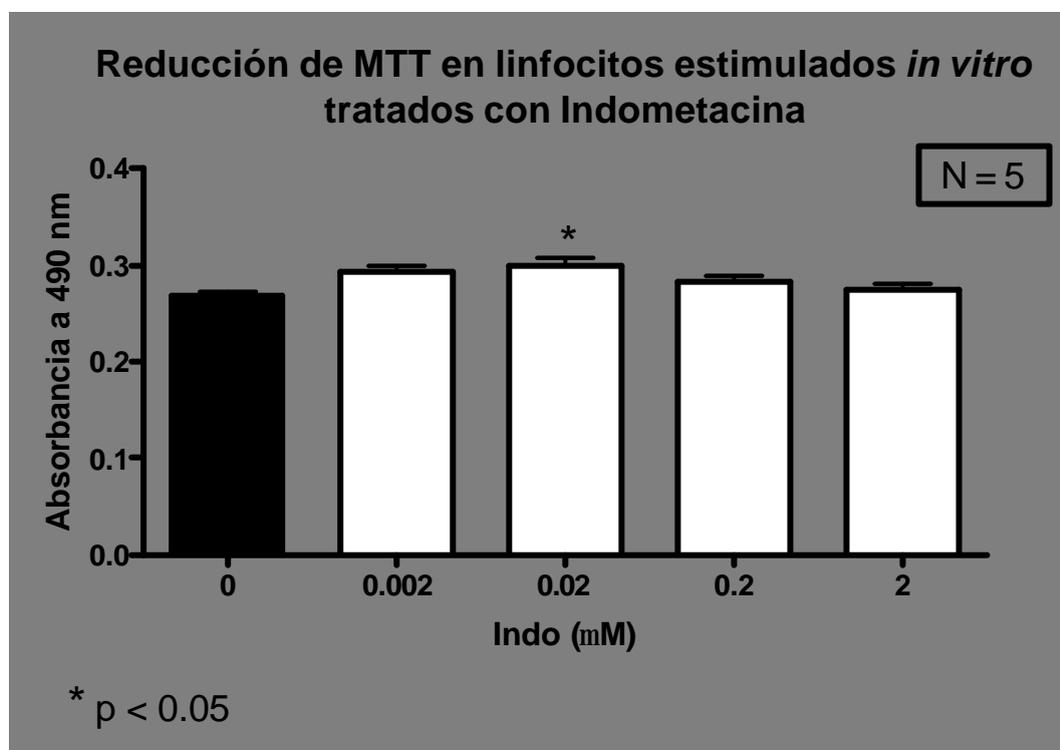
5.2.4 TRATAMIENTO DE LOS LINFOCITOS *IN VITRO* CON INDO

En la tabla siguiente se muestran los valores promedio obtenidos de la reducción de MTT de los linfocitos del bazo tratados *in vitro* con diferentes dosis de Indo más 5 mg/mL de Con-A, al terminar su cultivo por 51 horas.

Indo (μM)	0	0.002	0.02	0.2	2
Promedio Abs.	0.2674	0.2923	0.298	0.2821	0.2738
Desviación estándar	0.01725	0.02235	0.02974	0.02526	0.02229
Error estándar	0.004979	0.006452	0.008586	0.007292	0.006435

La figura 8 es una representación gráfica de estos mismos valores.

FIGURA 8.



En este experimento se obtuvo un ligero aumento en la reducción de MTT a la concentración de 0.02 mM de Indo; solo una concentración de este antiinflamatorio estimuló significativamente a los linfocitos en la reducción del MTT. Hay autores que reportan que la Indo disminuye la Infoproliferación pero también hay otros autores que han encontrado lo contrario. El trabajo solo estudió el efecto de los fármacos sobre la reducción de MTT y no la linfoproliferación.

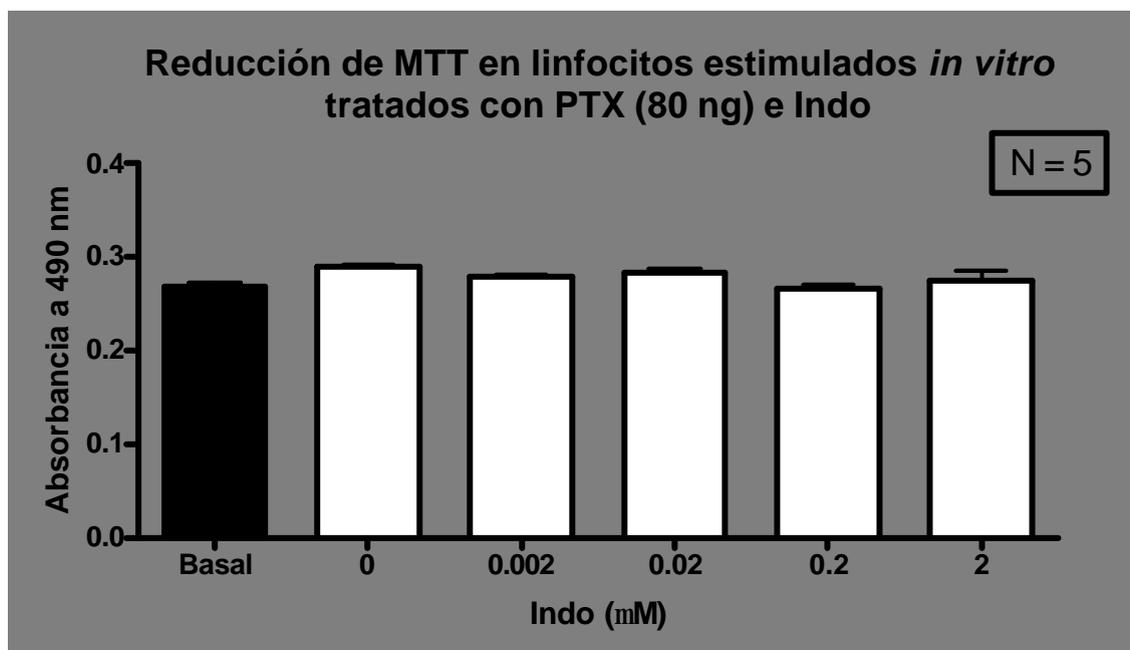
5.2.5 TRATAMIENTO DE LOS LINFOCITOS *IN VITRO* CON PTX (80 ng) E INDO

En la tabla siguiente se muestran los valores promedio obtenidos de la reducción de MTT de los linfocitos del bazo tratados con una dosis constante de PTX (80 ng) más diferentes dosis de Indo en presencia de 5 mg/mL de Con-A al terminar su cultivo.

Indo (μM)	Basal	0	0.002	0.02	0.2	2
Promedio Abs.	0.2674	0.2883	0.2775	0.2825	0.2667	0.2748
Desviación estándar	0.01725	0.01063	0.01409	0.01357	0.01439	0.03208
Error estándar	0.004979	0.003068	0.004067	0.003919	0.004153	0.009261

La figura 9 es una representación gráfica de estos mismos valores.

FIGURA 9.



Se puede observar que no existe diferencia significativa en la reducción del MTT cuando los linfocitos se cultivan en presencia de PTX, a una dosis de 80 ng más diferentes dosis de Indo.

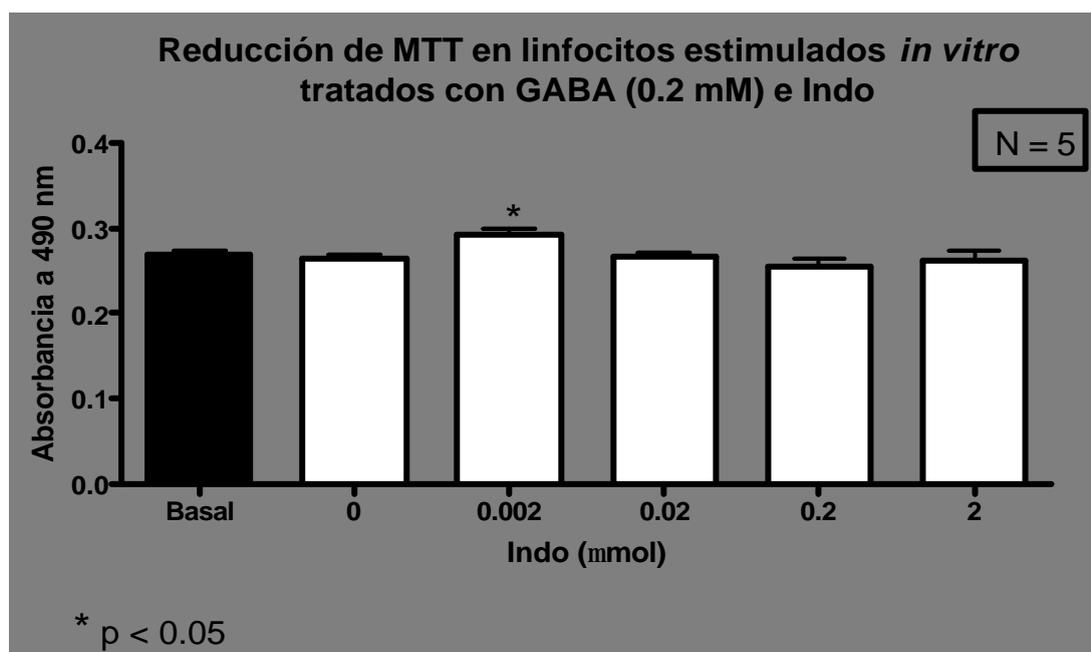
5.2.6 TRATAMIENTO DE LOS LINFOCITOS *IN VITRO* CON GABA (0.2 mM) E INDO

En la tabla siguiente se muestran los valores promedio obtenidos de la reducción de MTT de los linfocitos del bazo tratados con una dosis constante de GABA (0.2 mM) mas diferentes concentraciones de Indo en presencia de Con-A (5 mg/mL).

Indo (μ M)	Basal	0	0.002	0.02	0.2	2
Promedio Abs.	0.2674	0.2639	0.2927	0.2665	0.2541	0.2612
Desviación estándar	0.01725	0.01888	0.02213	0.01324	0.03395	0.04318
Error estándar	0.004979	0.00545	0.006388	0.003821	0.009801	0.01247

La figura 10 es una representación gráfica de estos mismos valores.

FIGURA 10.



La figura 10 presenta un aumento significativo en la reducción de MTT cuando se administra *in vitro* GABA (a una dosis que probó ser inhibitoria de esta actividad metabólica) más Indo, a las diferentes dosis empleadas anteriormente (figura 9).

Al comparar estos resultados (figura 10) con los de la figura 7 (reducción de MTT en linfocitos tratados con GABA *in vitro*) se puede apreciar que la Indo presenta un efecto contrario al que manifestó el GABA al combinar ambos fármacos.

La bibliografía refiere que la Indo y el GABA disminuyen la proliferación de los linfocitos cuando se administran *in vitro*.

En este trabajo experimental sólo se estudió el efecto de estas sustancias (y otras más) solas y en combinación, sobre la actividad metabólica de los linfocitos provenientes del bazo, en ratones Balb-C.

6. Análisis estadístico.

6.1 PRUEBA DE TUKEY.

Esta prueba es indicada para hacer el análisis estadístico de los datos experimentales porque es una de las que se utilizan para analizar si existen diferencias significativas al comparar de manera múltiple diferentes grupos de datos.

El nivel de significancia establecidos fue del 95% y 99.9% para todos los experimentos realizados.

En las siguientes tablas se muestran las comparaciones que presentan diferencia significativa.

a) Concanavalina-A

Prueba de Comparación múltiple de Tukey (Con-A mg/mL)	Valor de P
0 vs 3	P < 0.05
0 vs 5	P < 0.05

b) Picrotoxina

Prueba de Comparación múltiple de Tukey (Picro ng/mL)	Valor de P
0 vs 80	P < 0.001
10 vs 80	P < 0.001
20 vs 80	P < 0.001
40 vs 80	P < 0.01
80 vs 100	P < 0.001

c) GABA

Prueba de Comparación múltiple de Tukey (GABA mM)	Valor de P
0 vs 0.25	P < 0.05

d) Indometacina

Prueba de Comparación múltiple de Tukey (Indo mM)	Valor de P
0 vs 0.02	P < 0.05

e) Picrotoxina + Indometacina

Las comparaciones multiples por la prueba de Tukey no presentan diferencia significativa.

f) GABA + Indometacina

Prueba de Comparación múltiple de Tukey (GABA mM + Indo mM)	Valor de P
0.002 vs 0.2	P < 0.05

7. Discusión de resultados.

Las ciclooxigenasas (COX) son las enzimas que convierten el ácido araquidónico en prostaglandinas (PG), las cuales son uno de los mediadores más importantes de la respuesta inflamatoria, pero también de numerosos procesos fisiológicos como la fiebre y la modulación de la respuesta del sistema inmune.

Paradójicamente, aunque son excelentes inductores de reacciones inflamatorias, las PG también tienen efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores. La adición de PG a cultivos de linfocitos les inhibe la proliferación y la producción de citocinas. La PGE2 inhibe la diferenciación de los linfocitos TH1 y disminuye la expresión de receptores para IL-12 (IL-12R); asimismo, suprime la producción de IL-12 inducida por lipopolisacáridos (LPS). La PGE2 también suprime la producción de IL-2 por los linfocitos T⁷³. Este efecto sobre las poblaciones de linfocitos TH1 es diferente al efecto que las mismas PGE2 tienen sobre los linfocitos TH2, ya que a éstos les aumentan la producción de la IL-4 y la respuesta proliferativa de los linfocitos B⁷¹.

A la inversa, cuando a los cultivos de linfocitos se les adiciona algunos de los inhibidores de la síntesis de PG, como la indometacina (Indo), les aumenta la proliferación y el grado de activación. Indo mejora la respuesta tipo-TH1, principalmente la producción de IL-12, óxido nítrico e interferón-gamma⁷⁵.

La Indo forma parte de la familia de las drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAID), las cuales se caracterizan porque reducen la síntesis de PG, aumentan la proliferación de los linfocitos e incrementan la síntesis de varias citocinas, como el TNF α , que estimulan a los linfocitos T⁴². En los humanos y después de un estrés físico intenso, la Indo aumenta considerablemente los niveles en el suero de TNF α , IL-6 e IL-10⁷³. Esos efectos de la Indo sobre el sistema inmune han conducido a recomendar el uso de estos inhibidores de COX durante la inmunoterapia del cáncer⁴². Al contrario, los tratamientos con anti-depresivos, que disminuyen la producción de TNF α , no son recomendables para las personas en tratamiento por cáncer.

En este sentido conviene señalar, aunque parezca paradójico, que a pesar de que las NSAID se administran por su potente efecto anti-inflamatorio, al elevar la producción de $\text{TNF}\alpha$ están aumentando la síntesis de una de las citocinas pro-inflamatorias más potentes.

En los últimos años se ha comprendido que las PG forman una familia de moléculas similares que tienen un espectro heterogéneo de actividades biológicas. Administrar una NSAID y disminuir la síntesis de las PG, provoca una serie de consecuencias, algunas de las cuales son favorables mientras otras resultan completamente deletéreas. Un ejemplo puede ser el caso reciente acerca de los efectos perjudiciales que tiene la administración del VIOXX (un anti-inflamatorio de la familia NSAID) y de como su fabricante Merck y la FDA decidieron retirarlo del mercado en medio de las demandas de los usuarios y a pesar de su efectividad como un anti-inflamatorio⁷⁴. Es indudable que la manipulación farmacológica del dolor y la inflamación forma parte de un capítulo muy complejo que todavía no se cierra y sobre el cual es necesario continuar investigando. En esta línea está incluido el presente trabajo, que explora los probables efectos colaterales de la Indo sobre la actividad metabólica de los linfocitos.

Los efectos de las NSAID sobre los linfocitos ya han sido estudiados desde hace años⁷⁶ y, más recientemente, se ha observado interés por conocer los efectos de las NSAID sobre las células del sistema inmune en situaciones tales como el cáncer⁴² o el estrés⁷³. En esos casos, la enfermedad primaria provoca cambios en la producción de sustancias que influyen sobre la respuesta del sistema inmune de una manera que contrarresta o potencializa los efectos colaterales de los NSAID.

Inicialmente, se propuso que la Indo actuaba principalmente sobre los monocitos y les provocaba una disminución en su síntesis de PG. De este modo, indirectamente, el efecto de la Indo sobre los monocitos facilitaba la respuesta de los linfocitos, solamente porque éstos dejaban de estar bajo la acción supresora de las PG. Sin embargo, estudios posteriores sobre una línea Jurkat de células linfoides tumorales permitieron estudiar la respuesta de los linfocitos en un medio que no contenía monocitos y los resultados mostraron que la hdo actuaba directamente sobre las células linfoides y tenía un efecto estimulante sobre ellas. Hasta ahora no se han encontrado evidencias de que los linfocitos puedan sintetizar PG⁷². Pero sí se ha establecido que los linfocitos y los

macrófagos del sistema inmune pueden estar sujetos a condiciones particulares (ya se mencionó el estrés y el cáncer, pero se podría citar el embarazo o el envejecimiento) en las cuales los linfocitos no van a responder a la Indo de una manera convencional.

En el momento de diseñar los experimentos del presente trabajo, nosotros hemos aceptado los antecedentes en favor de que el efecto de los NSAID sobre las células del sistema inmune puede ser una consecuencia de mecanismos que actúan tanto directa como indirectamente. Sin embargo, no decidimos estudiar como Rhind el efecto de la Indo sobre las citocinas que producen las células del sistema inmune, sino más bien el efecto de la Indo sobre la actividad metabólica de linfocitos del sistema inmune que han estado expuestos a productos del sistema nervioso central (SNC).

Para ello los experimentos se diseñaron con cultivos de linfocitos a los cuales se les añadió (a) GABA que es un neurotransmisor inhibitorio que puede actuar sobre la actividad metabólica de los linfocitos y (b) Picrotoxina (PTX) que es un antagonista de los receptores A para GABA. Trabajos preliminares¹⁰ habían demostrado que los linfocitos responden al efecto de GABA pero no existen datos sobre el efecto que pudiera tener la PTX sobre ellos. La hipótesis de nuestros experimentos propone que la adición de Indo al medio de cultivo va a modificar la actividad metabólica de los linfocitos independientemente de que hayan sido o no tratados con GABA y el antagonista de su receptor.

Los resultados nos muestran que a ciertas dosis (0.02 μ M) la Indo puede aumentar significativamente la actividad metabólica de los linfocitos cuando éstos se encuentran en un medio sin GABA ni PTX. Pero cuando la Indo se añadió a cultivos de linfocitos que estaban pre-incubados con GABA o PTX, los resultados fueron diferentes.

En la primera parte del estudio se pudo comprobar que los linfocitos incubados con el antagonista del receptor para GABA (Picrotoxina) aumentaban progresivamente su capacidad para reducir el MTT en una forma dependiente de la dosis. Desde un valor de 0.23 ± 0.024 a otro de 0.32 ± 0.04 , para dosis de PTX iguales a diez y 80 ng, respectivamente. A mayor cantidad de PTX en el medio (desde diez hasta 80 ng), se observó mayor reducción de MTT. Este resultado no se esperaba, porque la PTX directamente no modifica el flujo de iones cloro por el canal del receptor para GABA, sino que simplemente bloquea el efecto de un GABA pre-existente. Nosotros suponemos que

ese GABA, que es necesario para explicar el efecto de la PTX, probablemente estaba presente en el suero con el que se suplementó el medio de cultivo. Cuando se añadió la PTX al medio de cultivo, desapareció ese efecto inhibitor del GABA del medio.

Pero más adelante, cuando se añadió la Indo al medio de cultivo entonces todas las células mostraron el mismo débil efecto estimulante. Las células incubadas solamente con 0.02 μ M de Indo tenían valores de reducción del MTT cercanos a 0.3 pero al añadir la Indo a células que ya tenían PTX los valores promedio fueron ligeramente más bajos y estuvieron entre 0.26 y 0.27 \pm 0.017, con o sin una cantidad constante de PTX. Nosotros esperábamos que los efectos de la PTX y la Indo se sumaran, pero aparentemente no fue así.

Con estos resultados no podemos conocer exactamente el mecanismo por el cual la adición de Indo suprime las diferencias entre los linfocitos control sin PTX y los linfocitos problema con PTX. Pero se puede dejar para futuras investigaciones el estudio de los mecanismos por los cuales la Indo, que reduce las PG producidas por los macrófagos (que también se encuentran en el medio de cultivo), no suma su efecto estimulante al de la PTX que bloquea el efecto inhibitor del GABA.

El tratamiento con GABA a dosis entre 0.6 y 2 mM solo modificó la reducción *in vitro* del MTT por las células del bazo de los ratones estudiados. No hubo diferencias entre los controles sin GABA y las células incubadas con cantidades crecientes de ese neurotransmisor inhibitorio. Esto era de esperarse, ya que el efecto del GABA reduce a la basal las actividades metabólicas de los linfocitos. En estas células pre-incubadas con GABA, una dosis de la Indo (0.002 μ M) aumentó significativamente la reducción del MTT, lo cual fue un resultado esperado. Pero con el diseño de este experimento, utilizando una población heterogénea de células del bazo, es imposible aclarar si la Indo redujo o no la producción de PG por los monocitos/macrófagos o estimuló directamente las células linfoides. De todos modos, fue obvio que las pequeñas dosis de Indo utilizadas anularon *in vitro* el efecto del GABA y que, teóricamente, *in vivo* podrían haber tenido el mismo efecto modulador. De este modo, los resultados confirman que la terapéutica aplicada en los procesos inflamatorios (infecciosos) no solo reduce la inflamación sino además puede influir sobre la modulación de la respuesta defensiva de los linfocitos, en la que también pueden participar neurotransmisores.

8. Resumen.

En este trabajo experimental se estudió, a través de la técnica de reducción del MTT, el efecto que tienen diferentes dosis del ácido gamma aminobutírico (GABA), la Picrotoxina y la Indometacina, sobre la actividad metabólica de los linfocitos estimulados con la Concanavalina-A. Se trabajó sobre cultivos de linfocitos de bazo provenientes de ratones BALB/C. El trabajo se fundamenta en los antecedentes que han probado, en los últimos 25 años, la existencia de una comunicación bidireccional entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino. Los tres sistemas comparten la capacidad para producir receptores y sus respectivos ligandos (citocinas, neurotransmisores y hormonas) que actúan como mensajeros de cada uno de estos sistemas y también entre ellos. Así, los cambios fisiológicos en la producción de los ligandos y los receptores para estos mensajeros conforman un sistema de comunicación que ayuda a mantener el estado de equilibrio u homeostásis en el cuerpo y que, cuando se altera, se encuentran relacionados con una diversidad de enfermedades.

El ácido gamma aminobutírico es el ligando natural de los receptores para GABA tanto en el sistema nervioso así como en los tejidos periféricos. Es uno de los reguladores de la transmisión sináptica en el cerebro, regulando funciones como la agresión, aprendizaje, memoria y la respuesta de estrés. La presencia de sus receptores sobre los linfocitos ha sido recientemente reportada y se ha visto que, a bajas concentraciones, inhibe su respuesta inflamatoria, la progresión en el ciclo celular, procesos autoinmunes y su citotoxicidad. Los antagonistas del receptor para GABA, como la Picrotoxina, bloquean ese efecto. La indometacina es un fármaco antiinflamatorio que se utiliza para inhibir los síntomas de enfermedades degenerativas crónicas y que puede actuar sobre los linfocitos de una manera opuesta al GABA.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el efecto que tiene sobre la actividad metabólica de los linfocitos cultivados con diversas dosis de GABA y de la indometacina, solas o combinadas, con la finalidad de establecer si su efecto es o no aditivo. También se buscó conocer el efecto que ejerce la Picrotoxina sobre los linfocitos.

Hasta este momento solo se conoce los efectos del GABA sobre los Infocitos pero, se desconoce el efecto que tiene la Picrotoxina o el efecto que pudiera tener *in vitro* la adición de GABA e Indometacina juntas sobres las funciones de los linfocitos de ratones BALB/c.

Los resultados demostraron que 1) el GABA inhibe la respuesta metabólica *in vitro* de los linfocitos previamente estimulados, a la dosis de 0.25 mM, 2) la Picrotoxina estimula esta respuesta de manera significativa a dosis de 80 ng, 3) la Indometacina también estimula la actividad metabólica de los linfocitos del bazo, solo que a una dosis de 0.02 μ M, 4) cuando se combina la Picrotoxina con la Indometacina, esta ultima anula el efecto estimulatorio de la PTX a todas las dosis usadas, desde 0.002 mM hasta 2 mM, y 5) paradójicamente, la Indometacina también anula los efectos inhibitorio que ejerce el GABA sobre la reducción del MTT.

9. Conclusiones.

- 1.- La Concanavalina A es un buen mitógeno *in vitro* para los linfocitos del bazo, los cuales aumentan su capacidad de reducir el MTT, cuando se le adiciona en el cultivo.
2. La Picrotoxina estimula la reducción de MTT en los linfocitos del bazo en una forma dependiente de la dosis pero, solo a 80 ng el aumento fue significativo.
- 3.- El GABA disminuye la reducción del MTT en los cultivos de los linfocitos, aunque solo es significativa cuando se usó a 0.25 mM.
- 4.- La Indometacina estimuló la reducción del MTT por los linfocitos del bazo pero el incremento solo fue significativo a una dosis de 0.02 μ M
- 5.- Cuando la Indometacina y la Picrotoxina se añadieron juntas al cultivo de los linfocitos del bazo, todas las dosis de Indometacina, desde 0.002 μ M hasta 2 μ M, anularon el efecto estimulador que ejerce la Picrotoxina en la reducción del MTT.
- 6.- La indometacina también anula el efecto inhibitorio que ejerce el GABA sobre la reducción del MTT.

10. Bibliografía.

1. Gonzáles-Arenas A., Reyna-Neyra A., Gómez María de J. *Los mensajeros químicos del sistema neuroinmunoendocrino*. Educación Química 12 [3] : 158-162, Julio 2001.
2. Nio D. A., Moylan R. N., Roche J. K. *Modulation of lymphocyte función by neuropeptides* J. Immunology, 150 [12] : 5281-5288, 1993.
3. Besedovsky H. O., Del Rey A. E., Sorkin E. *Immune-neuroendocrine interactions*. J. Immunology, 135 [2] : 750s-754s, 1985
4. Steven Locke. *El médico Interior*. Ed. Hermes, México 1991. p.71-91
5. Goth Andrés. *Farmacología Médica. Principios y conceptos*. 8ª. Edición. Ed. Interamericana, 1977, p.48-58.
6. Guyton, H. *Tratado de Fisiología Médica*. 9ª. Edición. McGraw-Hill Interamericana.1997 p.447-483, 615-619, 623
7. Ganong William F., *Fisiología médica 13º Edición*. Ed. El Manual Moderno. México 1992 p.85-93
8. Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9 edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana, México 1996 p. 119-138, 201-208, 295, 557, 661-667, 679-980
9. Bennington James. *Diccionario enciclopédico del Laboratorio Clínico*. Ed. Médica Panamericana. 1991 p. 47, 1008, 1270.
10. Tian J Chau C. Hales T. G., Kaufman D. L., *GABA_A receptors mediate inhibition of T cell responses*. J. Neuroimmunol, 96 : 21-28, 1999.
11. Siegel G. J., Agranoff B. W., Fischer S. K., *Basic Neurochemistry, cellular and medical aspects. Sixth edition*. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1999 p.336-343
12. Cooper Jack R., *The biochemical basis of neuropharmacology. Sixth Edition*. Ed. Oxford University Press. Oxford 1991, p.154-156
13. Bradley Philip B. *Introduction to Neuropharmacology*. Ed. Wright, 1989, p.143-152, 276
14. Cooper Jack R., *Las bases bioquímicas de la neurofarmacología*. Ed. El Manual Moderno. México 1977, México, Traducción de la 2da. edición p.174-193
15. Pasantes H Sánchez J. *Neurobiología celular*. SEP, FCE. México 1991 p. 173-175

16. Erdö S. L., Wolff J R. *g-Aminobutyric Acid outside the Mammalian Brain*. J. Neurochemistry, 54 [2] : 363-368, 1990
17. Macdonald R. I., Olsen R. W. *GABA_A Receptor channels*. Ann. Rev. Neurosci. 17 : 569-602, 1994.
18. Olsen R. W., Tobin A J., *Molecular biology of GABA_A receptors*. FASEB J. 4 : 1469-1478. 1990.
19. Bowery N.G., *GABA_B Receptor Pharmacology*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 33 : 109-147, 1993.
20. DeLorey T. M. Olsen R. W. *g-Aminobutyric Acid_A Receptor Structure and Function*. J. Biological Chemistry. 267 [24] : 16747-16750, 1992
21. Cooper J. R. *Las bases bioquímicas de la neurofarmacología*. Ed. El Manual Moderno. México 1984, Traducción de la 4ta edición p.200-226.
22. Bradford, H.F., *Fundamentos de Neuroquímica*. Ed. Labor, Barcelona 1986 pp.135-137, 218-232.
23. Moore T. C., *Neurovascular immunology. Vasoactive neurotransmitters and modulators cellular immunity and memory*. CRC Press. 1993 pp.23-29.
24. Bormann J. *The "ABC" of GABA receptors*. Pharmacol Sci, 21 : 16-19, 2000.
25. Manocha A. *Pharmacology of GABA_C receptors*. Indian Journal of Pharmacology, 30 : 218-226, 1998.
26. Slater T. F. Sawyer B. Sträuli U. *Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts*. Biochim. Biophys. Acta, 77 : 383-393, 1963.
27. Green L. M., Reade J. L., Ware C. F., *Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines*. J. Immunol Meth, 70 : 257-268, 1984.
28. Sargent J. M., Taylor C. G., *Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia*. Br. J. Cancer, 60 : 206-210, 1989.
29. Carmichael J., Mitchell J. B., DeGraff W. G., *Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay*. Br. J The Macmillan Pres Ltd 1988.
30. Vistica D. T., Skehan P., Scudiero, D. *Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production*. Cancer Res, 51 : 2515-2520, 1991.
31. Mossman T, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and citotoxicity assays*. J. Immunol Meth 65 : 55-63, 1983.

32. Sieuwerts A. M., Klijin G. M., Peters H A., *The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC₅₀-values and cell survival.* Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem, 33 : 813-823, 1995.
33. Denizot F., Lang R., *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.* J. Immunological Methods, 89 : 271-277, 1986
34. Serhan C. N., *Molecular and cellular basis of inflammation.* Humana press, New Jersey 1999, p. 294-297
35. Choudry MA, Mao H., *Role of NFAT and AP-1 in PGE2-mediated T cell suppression in burn injury.* Shock, 18 : 212-6, 2002
36. Choudry MA., Fazal N., Namak SY., *PGE2 suppresses intestinal T cell function in thermal injury: a cause of enhanced bacterial translocation.* Shock, 16 : 183-8, 2001
37. Coon P. M. *Principios de Farmacología.* Ed. El Manual Modemo. México D.F. 1991 p.323-325, 341
38. Gijon B. J. *Inflamación y dolor. Conceptos básicos.* Grupo Aula Médica. 1997 p. 1-18
39. Williams William J. *Hematology.* Fifth edition. Ed. Mc Graw-Hill USA p. 48-55
40. Bevan J. A. *Fundamentos de farmacología.* 2ª. Edición. Ed. Harla. México 1992 p. 291-294
41. Brooks P. M., Day R. O., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs- differences and similarities.* The New England Journal of Medicine, 324 [24] : 1716-1723, 1993.
42. Kast R. E., *Tenofovir, COX inhibitor and zileuton during cancer immunotherapies: up-regulated TNF- α increases antigen driven lymphocyte proliferation.* Mol immunol, 40 [5] : 297-303, 2003.
43. Goldstein Ira M., *Agents that interfere with arachidonic acid metabolism.* Inflammation: Basic principles and clinical correlates. 2nd edition. Raven Press. New York 1992 p. 1127-1134
44. García Tamayo Fernando, *Proyecto: consecuencias de la administración de indometacina durante el embarazo sobre la producción de IL-6 y el desarrollo embrionario del cerebro en ratones BALB/c.*
45. Remington. *Farmacía* 2da. Edición. Tomo 2. Ed. Médica Panamericana Argentina 17ª edición p. 1728-1729; 1733-1734

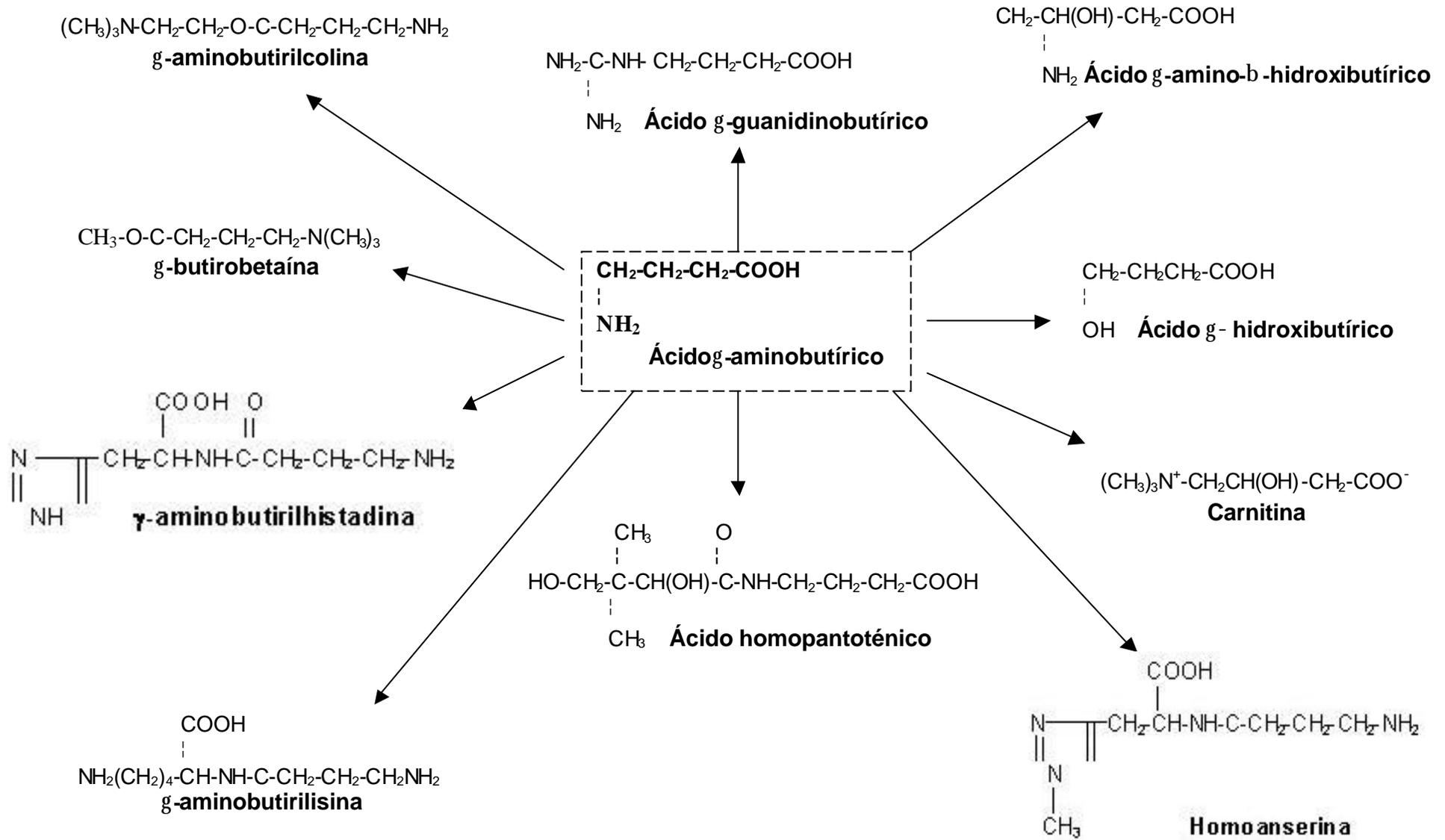
46. Girdwood R. H. *Terapéutica Médica*. 15ª edición. Ed. El manual moderno. México 1992. p. 608-612
47. Campos H. *Uso racional de los antiinflamatorios no esteroideos*. Disinlimed Caracas 1991. p. 43-51, 57-65, 97-113, 140-147.
48. Rivero M., Santiago B., Galindo M., *Cyclooxygenase-2 inhibition lacks immunomodulatory effects on T cells*. Clin. Exp. Rheumatol. 20 [3] : 379-85. 2002
49. Kis B., Snipes JA., Isse T., Nagy K., Busija DW., *Putative Cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells*. J. Cereb. Blood Flow Metab, 23 [11] : 1287-92, 2003.
50. Kis B., Snipes A., Bari F., Busija DW., *Regional distribution of cyclooxygenase-3 mRNA in the rat central nervous system*. Brain Res. Mol, 126 [1] : 78-80, 2004
51. Chandrasekharan N. V., Dai H, Tomsik J, Simmons D L., *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure and expression*. Proc. Natl. Acad. Sci, 99 [21] : 13926-13931. 2002
52. Reyes J L., Aldana I Meléndez E. *Efecto de la Furosemida y la Indometacina sobre la función renal en la rata recién nacida no anestesiada*. LXXXI Reunión reglamentaria de la asociación de la investigación pediátrica. Diciembre 1995. p. 265-277. Tequisquiapan, Querétaro.
53. Rothwell Nj, Hopkins Sj. *Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action*. Trends Neurosci, 18 : 130-6, 1995.
54. Uusaro A, Russell J. *Could anti-inflammatory actions of catecholamines explain the possible beneficial effects of supranormal oxygen delivery in critically ill surgical patients?* Intensive Care Med, 26 : 299-304, 2000.
55. Bergquist J, Ohlsson B, Tarkowski A. *Nuclear factor kB is involved in the catecholaminergic suppression of immunocompetent cells*. Ann. NY Acad. Sci, 917 : 281-9, 2000.
56. Takahashi Hk, Iwagaki H, Mori S, Yoshino T, Tanaka N, Nishibori M. *b2-adrenergic receptor agonist induces IL-18 production without IL-12 production*. J Neuroimmunol, 151 : 137-47, 2004.
57. Barua M, Liu Y, Quinn Mr. *Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and IkappaB kinase activity*. J Immunol, 167 : 2275-81, 2001.

58. Reyes García MG, Legorreta-Herrera M, Zhang L, García-Tamayo F. *GABAergic activity influences the in vitro IL-6 production*. Immunology-2004. Medimond SRL, Bologna, 2004, p. 319-322.
59. Sands S, Mccarson K, Enna S. *Differential regulation of GABA-B receptor subunit expression and function*. J. Pharmacol. Exp. Therap. 305 : 191-196, 2003.
60. Zhang Y, Gao X, Ji G, Huang Y, Wu G, Zhao Z. *Expression of 5-HT 1A receptor mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation*. Pain, 98 : 287-295, 2002.
61. Simjee S, Pleuvry B, Coulthard P. *Modulation of the gait deficit in arthritic rats by infusions of Muscimol and Bicuculine*. Pain, 109 : 453-460, 2004.
62. Zavala F, Taupin V Et Al. *In vivo treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of interleukin-1, tumor necrosis factor and interleukin-6*. J. Pharmacol. Exp. Therap, 255 : 442-450, 1990.
63. Wilms H, Claasen J, Röhl C, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. *Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro*. Neurobiol. Dis, 14 : 417-424, 2003.
64. Rainsford K, Ying C, Smith F. *Effects of meloxicam, compared with other NSAIDs, on cartilage proteoglycan metabolism, synovial prostaglandin E2, and production of interleukins 1, 6 and 8, in human and porcine explants in organ culture*. J. Pharm Pharmacol. 49 : 991-8, 1997.
65. Khisti R, Chopde C. *Serotonergic agents modulate antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice*. Brain Res. 865 : 291-300, 2000.
66. Deshpande L, Khisti R, Chopde C. *Cataleptic effect of neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice: modulation by serotonergic agents*. Brain Res, 898 : 13-26, 2001.
67. De Laurentis A, Pisera D, Lasaga M, Diaz M, Theas S, Duvilanski B, Seilicovich A. *Effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha on GABA release from mediobasal hypothalamus and posterior pituitary*. Neuroimmunomodul. 7 : 77-83, 2000.
68. Mousa A, Seiger A, Kjaeldgaard A, Bakhiat M. *Human first trimester forebrain cells express genes for inflammatory and anti-inflammatory cytokines*. Cytokine, 11 : 55-60, 1999.

69. Raza M, Al-Shabanah O. *Effect of vigabatrin on contractile response to arachidonic acid and prostaglandins in smooth muscle preparations and platelet aggregation in experimental laboratory animals.* Pharmacol. Res, 47 : 477-483, 2003.
70. Diccionario Médico Enciclopédico. Ed. El Manual Moderno. México 1991 p1415
71. Kuroda E, Yamashita U. *Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E2 production and its suppressive role in Th1 activation in Th2-dominant BALB/c mice.* J. Immunol. 170 : 757-764, 2003.
72. Pablos JL, Santiago B, Carreira PE, Galindo M, Gómez-Reino JJ. *Cyclooxygenase-1 and -2 are expressed by human T cells.* Clin. Exp. Immunol. 115 : 86-90, 1999.
73. Rhind SG, Gannon GA, Shephard RJ, Shek PN. *Indomethacin modulates circulating cytokine responses to strenuous exercise in humans.* Cytokine, 19 : 153-158, 2002.
74. <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/vioxx/default.htm>
75. Pérez-Santos JLM, Talamás-Rohana P. *In vitro indomethacin administration upregulates interleukin-12 production and polarizes the immune response towards a Th1 type in susceptible BALB/c mice infected with Leishmania mexicana.* Parasite Immunol, 23 : 599-605, 2001.
76. Goodwin JS, Ceuppens JL. *Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on immune function.* Semin. Arthritis. Rheum, 13 : 134-143, 1983.
77. Tian Jide, Lu Yuxin, Zhang Hanwei, Chau Cindy H., Dang Hoa H. and Kaufman Daniel L. *γ -Aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model.* J. Immunol, 173 : 5298-5304, 2004.
78. Cárdenas Flores, Oscar. Tesis "Efecto de la Picrotoxina sobre la actividad metabólica de linfocitos del bazo de ratones CD1", Facultad de Química UNAM 2005

Apéndice 1.

Vías metabólicas alternativas para GABA



Apéndice 2.

Equipo, Soluciones y Reactivos

1. EQUIPO

- ★ Campana de flujo laminar
- ★ Placas de 96 pozos estériles
- ★ Micropipetas individuales automáticas y multicanal
- ★ Puntas de micropipetas estériles y no estériles
- ★ Hemocitometro con cubreobjetos (Cámara de Neubauer)
- ★ Jeringas de 5 mL estériles
- ★ Contador de células manual
- ★ Recipientes de unicel y plástico
- ★ Guantes de látex
- ★ Tubos de centrifuga estériles de 15 mL
- ★ Estufa de cultivo con CO₂
- ★ Microscopio de luz e invertido
- ★ Agujas de jeringas de 1 mL estériles
- ★ Caja Petri estériles
- ★ Equipo y tabla de disección
- ★ Hielo
- ★ Cámara de vidrio con tapa
- ★ Centrifuga
- ★ Viales
- ★ Gradillas
- ★ Cronómetro
- ★ Alcohol al 70% y algodón
- ★ Éter

2. SOLUCIONES Y REACTIVOS

❖ *Medio de cultivo:*

- ★ Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado al 10% con suero bovino fetal (Gibco) el cual deberá estar previamente inactivado por calor (56°C durante 30 min.), también se le añade:
- ★ Antibióticos al 1%: Penicilina G sódica (10,000 U/mL), sulfato de Estreptomicina (10,000 mg/mL)
- ★ Aminoácidos no esenciales (Gibco) al 1%
- ★ Piruvato 100 mM (Gibco) al 1%
- ★ Ácido N-2-hidroxiethyl piperina N-2-etanosulfónico (HEPES) (Gibco) 25 mM al 0.5%
- ★ Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 2%

Si es necesario, ajustar a pH 7.2 – 7.4. El medio de cultivo se mantiene a 4°C.

❖ *Solución de Hanks:*

Disolver las siguientes sales en 300 mL de agua destilada:

★ KCl	0.40 g
★ Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.309 g
★ KH ₂ PO ₄	0.06 g
★ NaHCO ₃	0.35 g
★ CaCl ₂	0.14 g
★ MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.10 g
★ MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10 g
★ NaCl	8.0 g
★ D-Glucosa	1.0 g

Agregar agua destilada para 1 litro. Ajustar pH a 7.4 con HCl 1M o NaOH 1M antes de llevar al aforo. Filtrar para esterilizar. Se puede guardar hasta 1 mes a 8°C. Las cantidades y el volumen pueden variar siempre que se mantenga la proporción.

❖ **Solución de azul tripano**

- ★ Azul tripano 0.4% en SSI estéril.

Se guarda a temperatura ambiente.

❖ **Solución de Concanavalina-A:**

- ★ Concanavalina-A (Sigma) 25 mg
- ★ NaCl 6M 10 mL

Se agita durante toda la noche. Esta solución tiene una concentración de 2.5 mg/mL. Realizar los cálculos necesarios para preparar diferentes diluciones, las cuales se realizan en medio de cultivo RPMI 1640 y en una zona estéril. Guardar en congelación.

❖ **Solución de Picrotoxina.**

- ★ Picrotoxina (Sigma) 1 mg
- ★ Medio de cultivo RPMI 1640 1 mL

Se prepara esta solución en una zona estéril. Esta solución tiene una concentración de 1mg/mL (1000 µg/mL). Realizar los cálculos necesarios para preparar las diferentes diluciones las cuales se realizan en medio de cultivo RMPI 1640.

❖ **Solución de GABA**

- ★ GABA 1.030 g
- ★ Medio de cultivo RPMI 1640 2.5 mL

Se prepara esta solución en una zona estéril. Esta solución tiene una concentración de 4 mM. Se disuelve y se guarda en congelación. Realizar los cálculos necesarios para realizar las respectivas diluciones, las cuales se van a realizar en medio de cultivo RPMI 1640.

❖ **Solución de Indometacina.**

- ★ Indometacina 21.5 mg
- ★ Etanol absoluto 3 mL

Esta solución tiene una concentración de 0.020 mM. La indometacina se debe disolver primero en el menor volumen de etanol absoluto. y se guarda en refrigeración. Realizar los cálculos necesarios para realizar las respectivas diluciones, las cuales se van a realizar en medio de cultivo RPMI 1640.

❖ **Solución de MTT**

- ★ MTT 25 mg
- ★ SSI estéril 5 mL

Se prepara esta solución en una zona estéril. Proteger el MTT de la luz. Realizar los cálculos necesarios para realizar las respectivas diluciones, las cuales se van a realizar en SSI estéril, se protegerán de la luz y se guardaran en congelación.

❖ **Solución de lisis**

- ★ HCl 0.1 N
- ★ SDS 10%

Agregar el SDS muy lentamente y agitar suavemente hasta la disolución del SDS, para evitar la formación de burbujas. Tener cuidado de NO calentar la solución. Mantener a temperatura ambiente.

Apéndice 3.

Abreviaturas

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
°C	Grados centígrados
12-HETE	Tromboxano 12-hidroxitetraenoico
12HPETE	Ácido hidroperoxideicosatetraenoico
3-APA	Ácido-3-aminopropilfosfonico
3-APMPA	Ácido-3-aminopropil (metil) fosfinico
3-APPA	Ácido-3-aminopropilfosfinico
3 α -5H α THP	3 α -hidroxi-5 α -pregnan-2-ona
5-HT	Serotonina o 5-Hidroxitriptamina
A	Adrenalina
AC	Adenilatociclase
Ach	Acetilcolina
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
AMPc	Adenosilmonofosfato cíclico
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspartico
ATP	Adenosintrifosfato
BCR	Receptor de antígenos de superficie
BZP	Benzodiazepinas
CACA	Ácido cis-4-aminocrotonico
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CAM	Moléculas de adherencia molecular
CAMP	Ácido cis-2-aminometil-ciclopropano carboxílico
Células NK	Células asesinas naturales (natural Killer)
CMH (HMC)	Complejo mayor de histocompatibilidad
CO ₂	Dióxido de carbono
COMT	Catecol-metiltransferasa
Con-A	Concanavalina-A
Cox	Ciclooxigenasas

Cox-1	Ciclooxigenasa constitutiva
Cox-2	Ciclooxigenasa inducible
Cox-3	Ciclooxigenasa sensible a acetaminofen
CSF	Factores estimulante de colonias
DAG	Diacilglicerol
DMCC	metil-6, 7-dimetoxi-4-etil- β -carbolina-3-carboxilato
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
E	epinefrina
ELAM	Molécula de adhesión a endotelio
Elisa	(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensayo Inmunoenzimatico Absorbente)
Fc	Fragmento cristalizable
FcR	Receptor para fracción Fc
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
G CSF	Factor estimulantes de colonias de granulocitos
g	gramos
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor A para GABA
GABA _B	Receptor B para GABA
GABA _C	Receptor C para GABA
GABAR	Receptor para GABA
GABA-T	GABA-Transaminasa o GABA- α -oxoglutarato transaminasa
GABOB	Ácido- γ -amino- β -hidroxibutirico
GAD	Ácido glutámico Descarboxilasa o glutámico Descarboxilasa
GDP	Guanidindifosfato
GHB	γ -hidroxibutirato
GIF	Factor incremento glucocorticoide
Gli	Glicina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos
GMPc	Guanidinmonofosfato cíclico
GTP	Guanidin trifosfato
HCl	Ácido clorhídrico

Hepes	Ácido-N-2-hidroxietil-piperina-N-2-etanosulfónico
HHA	Eje hipotálamico-hipofisario-adrenal
HPBL	Leucocitos de sangre periférica
I4AA	Ácido imidazol-4-acético
ICAM-1	Molécula 1 de adhesión intracelular
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucinas
IL-1	Interleucina 1
IL-1ra	Receptores de interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
Indo	Indometacina
INF- γ	Interferón- γ
IP3	Inositolfosfato
KCL	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltons
KH ₂ PO ₄	fosfato ácido de potasio
LGL	linfocitos granulados grandes
Li	Litio
LPS	Lipopolisacáridos
LTs	Leucotrienos
LYP	Largo periodo de potenciación
MAO	Monoaminoxidasa
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min.	Minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
mRNA	RNA mensajero
MTT	Sal de tetrazolio (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ol)-2, 5-difeniltetrazolio)
mV	milivolts

NA	Norepinefrina, noradrenalina
Na ₂ HPO ₄	fosfato sódico
nAChR	Receptor acetilcolina-nicotínico
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamida adenin dinucleotido
NADPH	Nicotinamida adenin dinucleotido fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NDV	Virus de Newcastle
NGF	Factor de crecimiento epidémico
nm	nanometros
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Oxido nítrico
NSAID	Antiinflamatorios no asteroideas
P	Properdina
P4S	Ácido piridin-4-sulfónico
PAD	Despolarización de los aferentes primarios
PAF	Factor activador de plaquetas
PCOX-1	Proteínas derivadas de COX
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGs	Prostaglandinas
pH	potencial hidrógeno
Phe	Fenilalanina
PKA	Proteincinasa A
PKC	Proteincinasa C
PTX	Picrotoxina
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa
SAS	Semialdehído succínico
SDS	Dodesilsulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
SS	Semialdehído succínico
SSDH	Semialdehído succínico deshidrogenasa

SSI	Solución salina isotónica
TACA	Ácido trans-4-aminocrotonico
TBPS	t-butilciclofosforotionato
TCR/CD3	Receptor células T / CD3
TGF- β	Factor transformador del crecimiento β
T _H	Linfocitos Helper o cooperadores
THIP	4, 5, 6, 7-tetrahidroisoxazolo [5, 4-c] piridin-3-ol
THIP	Tetrahidroisoxazolopiridina
TMs	Dominios transmembranales
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPMPA	Ácido (1, 2, 3, 6-tetrahidropiridine-4-ol)metilfosfinico
TxA ₂	Tromboxano A ₂
TXs	Tromboxano
VCAM-1	Molécula de adherencia de células vasculares
μg	microgramos
μL	microlitros