

Libros de **Cátedra**

# Farmacodinamia general e interacciones medicamentosas

Mecanismos de acción de fármacos  
y metodologías de estudio experimental

Alicia E. Consolini y María Inés Ragone (coordinadores)

FACULTAD DE  
CIENCIAS EXACTAS

**e**  
exactas

  
Editorial  
de la Universidad  
de La Plata



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

# **FARMACODINAMIA GENERAL E INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS**

MECANISMOS DE ACCIÓN DE FÁRMACOS Y METODOLOGÍAS  
DE ESTUDIO EXPERIMENTAL

Alicia E. Consolini  
María Inés Ragone  
(coordinadores)

Facultad de Ciencias Exactas



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA



Editorial  
de la Universidad  
de La Plata

A todas las promociones de alumnos que inspiraron este libro,  
y a las que a futuro esperamos disfruten de la Farmacología al leerlo

# Agradecimientos

A los ex alumnos de la cátedra, ya Farmacéuticos, María Lara Lazarte, Lucía Clavellino y Matías Bayley, que tan alegremente han colaborado haciendo las ilustraciones de este libro, con entusiasmo y buen humor.

A los profesores de otras cátedras, a quienes invitamos a escribir sus respectivos capítulos basados en su enorme experiencia, y que aceptaron con gusto y gran dedicación.

*Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto,  
cambiaron todas las preguntas.*

MARIO BENEDETTI

# Índice

<b>Presentación y generalidades</b> _____	8
<i>Alicia E. Consolini</i>	
<b>Capítulo 1</b>	
Farmacodinamia del músculo esquelético _____	14
<i>María I. Ragone y Alicia E. Consolini</i>	
<b>Capítulo 2</b>	
Farmacodinamia cardíaca _____	35
<i>Alicia E. Consolini, R. Gisel Díaz y María I. Ragone</i>	
<b>Capítulo 3</b>	
Farmacodinamia del músculo liso en general y gastrointestinal _____	64
<i>Alicia E. Consolini y Germán A. Colareda</i>	
<b>Capítulo 4</b>	
Farmacodinamia del músculo liso genitourinario y respiratorio _____	86
<i>Germán A. Colareda y Alicia E. Consolini</i>	
<b>Capítulo 5</b>	
Farmacodinamia del músculo liso vascular _____	103
<i>Pedro Martín</i>	
<b>Capítulo 6</b>	
Interacción fármaco-receptor y farmacodinamia cuantitativa _____	113
<i>Alicia E. Consolini</i>	
<b>Capítulo 7</b>	
Psicofarmacología: farmacodinamia y modelos experimentales _____	141
<i>Silvia Wikinski</i>	
<b>Capítulo 8</b>	
Evaluación de la seguridad de productos farmacéuticos y biofarmacéuticos _____	164
<i>Pablo Quiroga</i>	

**Capítulo 9**

Interacciones medicamentosas \_\_\_\_\_ 182

*Alicia E. Consolini y María I. Ragone*

**Los autores** \_\_\_\_\_ 212

# Presentación y generalidades

*Alicia E. Consolini*

*¿De qué sirve un libro si no tiene dibujos?*

LEWIS CARROLL, *Alicia en el país de las maravillas*

La enseñanza de la Farmacología nos ha apasionado desde nuestros primeros pasos como Farmacéuticos, y como educadores hemos tratado de compendiar toda nuestra experiencia de estudio e investigación para facilitar la comprensión de la Farmacodinamia. Durante varias generaciones de alumnos hemos notado que el aprendizaje de los primeros capítulos de la Farmacología, y especialmente el campo experimental, han sido difíciles. En el diagnóstico de esta dificultad encontramos que esos temas no están fácilmente compendiados en capítulos enteros en los libros de texto de Farmacología, ya que la Farmacodinamia suele repartirse en los diversos temas como un prólogo a la Terapéutica. Otro problema suele ser el de la integración de conceptos fisiológicos, fisiopatológicos y farmacológicos necesaria para la resolución de situaciones experimentales. Y particularmente encontramos la dificultad en llevar los conceptos al terreno experimental: al alumno le cuesta imaginar cómo se observará un determinado efecto en un tejido o sistema aislado. En general, los libros de texto describen efectos y mecanismos pero muestran pocos esquemas y escasísimos registros experimentales. Tradicionalmente, el alumno recibe esos conceptos y explicaciones por transmisión oral de los docentes en las clases teóricas, los talleres o los trabajos prácticos, con las consiguientes dificultades de comprensión, relectura y fijación, por lo cual compendiarlos en este libro facilitará el proceso de aprendizaje.

Y recordemos que la Farmacología experimental es un campo importante de incumbencia del Farmacéutico y del Bioquímico en tanto trabajo en ámbitos de desarrollo de nuevos fármacos o de control biológico de fármacos de síntesis o fitoterapéuticos, o requiera evaluar la posible toxicidad de los mismos.

Este libro aúna la experiencia docente y de investigación de los autores, que además de enseñar Farmacología ejercemos tareas de tiempo completo en distintos ámbitos de aplicación, como son tres diversos laboratorios de investigación de la Facultad de Ciencias Exactas de UNLP, dos centros de investigación de las facultades de Medicina de la UBA y de UNLP respectivamente, la pertenencia al CONICET y un sector de Farmacología y Toxicología de la industria farmacéutica. Aspiramos a que nuestra experiencia asista al alumno en la construcción de los primeros conceptos farmacológicos, y en la interpretación o realización de experi-

mentos básicos de laboratorio. En este sentido, en la cátedra venimos observando que el proceso de adquisición de los conceptos farmacológicos es algo así como el aprendizaje de la lectura en un niño: al inicio hay gran dificultad en articular los diversos conceptos estudiados separadamente, hasta que se hace una repentina integración de los mismos y se empieza a pensarlos, a trabajarlos, a interpretar algunos resultados experimentales, a hipotetizar otros, y a generar protocolos de evaluación de efectos y mecanismos. Creemos que estos capítulos ayudarán a adquirir estos hábitos junto a la discusión oral en talleres y trabajos prácticos, con el último objetivo de que la Farmacología sea una asignatura adquirible en modo más razonado que memorístico, y que inspire al futuro profesional a ahondar el conocimiento farmacológico mediante la participación en equipos multidisciplinarios para el estudio preclínico de nuevos fármacos en la investigación, la industria o en organismos estatales de investigación y control farmacológico y toxicológico.

En el último capítulo, este libro brindará nuestra experiencia en la compilación y comprensión de mecanismos que originan interacciones medicamentosas, tema en el que hemos dado varios cursos de posgrado, y que representa otra dificultad al alumno. Esto es debido a que las mismas se citan en diversos capítulos de los libros de texto y no siempre se describe claramente el origen y significación clínica de los mismos. El futuro profesional participará del equipo de salud que evalúa estudios clínicos junto al médico, en los cuales pueden aparecer o evaluarse las interacciones medicamentosas. Además, deberá detectar o prevenir interacciones medicamentosas durante el seguimiento farmacoterapéutico de sus pacientes o en el consejo en la dispensa de un medicamento.

En conclusión, esperamos que este libro brinde conceptos e información que faciliten el aprendizaje de la Farmacología general y experimental al alumno, y que este conocimiento lo acompañe en su futuro profesional como herramienta de consulta.

## **Farmacología experimental**

La farmacología es la rama de las ciencias naturales que estudia la acción de ciertas sustancias químicas llamadas fármacos o drogas sobre las entidades biológicas, especialmente si se emplean con fines medicinales de uso humano o animal.

Históricamente, la Farmacología ha sido madre de otras ciencias biológicas, porque el hombre ha utilizado productos naturales con fines mágicos y médicos desde sus orígenes. Las propiedades benéficas o tóxicas de esos productos naturales, generalmente de plantas, se divulgaron oralmente aún antes de conocer el origen fisiopatológico del problema de salud tratado, o la estructura química del producto natural activo.

En todos los libros de texto podremos leer acerca de las varias ramas en las que se divide esta gran ciencia. Sin embargo, en este libro brindaremos fundamentalmente algunos conceptos aplicados a la Farmacología Experimental y a la comprensión del origen de las interacciones medicamentosas. Por lo cual, aparecerán conceptos básicos sobre:

**Farmacodinamia:** estudia los efectos y mecanismos de acción de los fármacos sobre los tejidos, órganos y sistemas, empleando metodologías experimentales de índole funcional, biofísica, bioquímica o molecular. Permite cuantificar la acción para poder comparar varios fármacos entre sí, y predecir efectos.

**Farmacocinética:** estudia los procesos por los cuales pasa un fármaco después de su administración al organismo (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y es clave en la determinación de efectos terapéuticos o tóxicos.

**Toxicología:** estudia la toxicidad de las sustancias o productos químicos en general. La toxicología farmacéutica estudia la seguridad de los medicamentos, mediante pruebas preclínicas y reportes de reacciones adversas clínicas.

Nuestro libro tiene la intención de ser un complemento al estudio de la Farmacología aplicada a la Terapéutica que se aborda en la mayoría de los libros de texto. Por lo tanto, los temas se restringen a aquellos en los cuales queremos ahondar en fundamentos, evidencias experimentales y razonamiento. Esto redundará en que trataremos pocos temas en relación a los que se pueden encontrar en un libro de texto de Farmacología, pero en ellos volcaremos nuestra experiencia de trabajo docente y científico.

Como muchos términos serán empleados para referirnos a los compuestos con actividad farmacológica, es bueno establecer las definiciones en este inicio del libro, que se describen a continuación.

## Conceptos de droga, fármaco y medicamento

Los conceptos de droga y fármaco pueden confundirse, especialmente cuando se lee una bibliografía en inglés, ya que citan indistintamente el término “drug”. Pero en los países de habla hispana, diferenciamos a los tres términos, y para la definición podemos referirnos a las brindadas en nuestra Farmacopea Nacional Argentina, 8<sup>va</sup> Edición, que se refiere a:

**“Principio activo o Droga farmacéutica:** toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana.”

**“Medicamento:** toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra.”

En nuestro texto, emplearemos el término “**fármaco**” como sinónimo de principio activo o droga farmacéutica.

En cuanto al término “**droga**” se deriva del término “Droga farmacéutica”, pero se refiere a un compuesto con idénticas propiedades de origen a las definidas pero que no tiene necesariamente aplicación en medicina humana. Utilizaremos este término en el estudio farmacológico de “nuevas drogas”, ya que si están en etapa de estudios experimentales preclínicos aún no fueron aprobadas para uso humano. También se emplea el término droga para las sustancias que solo se usan experimentalmente como herramienta farmacológica para determinar mecanismos de acción, pero no tienen aplicación clínica.

## **El concepto de receptor y de afinidad**

Algunas drogas o fármacos pueden causar alteraciones en el organismo actuando inespecíficamente. Por ejemplo, los anestésicos generales se incorporan a la membrana plasmática y causan un cambio fisicoquímico inespecífico que altera a las proteínas integradas que componen a varios canales iónicos.

Pero la mayor parte de los fármacos causan cambios altamente específicos en el organismo, por interactuar con ciertas partes de la célula por los cuales tienen afinidad, llamados **receptores**. El efecto depende de que la droga posea una estructura molecular con ciertos grupos químicos que interactúan con el receptor, cuando se administran en dosis relativamente bajas (terapéuticas). Algunas sustancias son efectivas aun cuando son administradas en dosis de microgramos por kilogramo de peso total. Solo una pequeña fracción de moléculas del organismo participa en la interacción con las moléculas de un fármaco o una droga, con una especial afinidad. Los receptores están constituidos por macromoléculas de las células (o parte de ellas), generalmente las glicoproteínas de la membrana plasmática, proteínas integradas con varios dominios transmembrana. Algunos pueden interactuar internamente con otras proteínas efectoras de una cascada de transducción que incluyen una o más enzimas (receptores metabotrópicos y receptores autocatalíticos). Otros receptores están contenidos en una subunidad de un canal iónico, al cual activan (receptores ionotrópicos). Otro grupo de receptores está en proteínas citosólicas que facilitan el movimiento del fármaco (u hormona) al interior del núcleo y su interacción con los ácidos nucleicos (receptores nucleares). Todos los receptores interactúan generalmente en forma reversible con moléculas de drogas con cierta similitud estructural (relación estructura-actividad) lo cual les da cierta selectividad.

Las interacciones droga-receptor son determinantes para la mayor parte de las drogas en uso, y se considera que la afinidad hacia los receptores es la primera condición para la actividad. Como resultado de la interacción se produce un cambio conformacional en el receptor, que se traduce en un efecto observable. Es muy probable que las moléculas de una droga específica tengan afinidad por otras estructuras del organismo a las que al unirse no producen ningún tipo de efecto. Estas estructuras son denominadas “receptores silenciosos”.

## Actividad intrínseca. Agonistas y antagonistas

La dependencia de la actividad de drogas con la afinidad resulta obvia, pero ¿es el único factor que determina la actividad? Este punto puede ilustrarse con los siguientes juegos de experiencias realizados con histamina y otros análogos:

Un efecto bien conocido de la histamina es que puede provocar una contracción de las fibras musculares lisas del intestino. Esto puede demostrarse con el preparado de íleon de cobayo "in vitro", en un medio nutriente apropiado. Si se agrega una concentración adecuada de histamina al medio, el preparado aislado reacciona con un cierto grado de contracción (supongamos que en un grado inferior a la contracción máxima). Entonces la histamina, se considera un agonista de esos receptores, que se denominaron H1. Un **agonista** es un compuesto que puede activar una vía fisiológica que conduce a un efecto. En el caso de que el tejido sea un músculo, el efecto podría ser de contracción o de relajación, por ejemplo histamina y acetilcolina son agonistas respectivamente en receptores H1 y M3 que provocan contracción en el intestino,, mientras adrenalina es un agonista de receptores  $\beta$ 2 que causan relajación.

En el experimento mencionado, luego el tejido se lava varias veces con el objetivo de remover la histamina, hasta observar la relajación del músculo. A continuación, el compuesto 3-( $\beta$ -aminoetil)-pirazol, un análogo de la histamina, se agrega en la misma concentración molar de la histamina del primer experimento, pero no se observa contracción. Si ahora se añade la dosis original de histamina, sin remover el análogo, la contracción resultante es idéntica a la primera obtenida con histamina sola. Una explicación de este resultado, es que este análogo no tiene afinidad por el receptor de la histamina en el órgano como resultado de la pequeña diferencia estructural.

Ahora el experimento se repite con otro derivado de histamina: el compuesto difenhidramina, y nuevamente no se obtiene respuesta en contracciones equimolares a las de histamina. Pero si se agrega la concentración original de histamina en su presencia, se reduce considerablemente el efecto del agonista histamina. Solo si altas concentraciones de histamina se agregan, se alcanzará el grado original de contracción. Claramente este compuesto se opone a la acción de la histamina, interpretando que deja una cierta fracción de los receptores no disponible para la interacción con histamina. En este caso, el compuesto tiene afinidad por el receptor, impidiendo que se una la histamina, pero no puede producir efecto por sí solo. Por ello es considerado un **antagonista**, y dado que su efecto puede ser revertido por más altas concentraciones del agonista, es definido como un antagonista competitivo del receptor H1.

Evidentemente el antagonista difiere de la histamina en un factor distinto de la afinidad. Es capaz de interactuar con los receptores pero esa interacción no es efectiva en la producción de la contracción muscular. La propiedad por la cual un agonista genera efecto se denomina **actividad o eficacia intrínseca**.

De estas experiencias surgen conceptos importantes: entre las drogas con afinidad hacia un receptor, existen sustancias con capacidad para provocar un cambio conformacional en el receptor que conduce a un efecto observable denominado actividad intrínseca o eficacia (son

agonistas), y otras que carecen de esta capacidad pero conservan la afinidad por el receptor (son antagonistas).

Un antagonista (droga sin actividad intrínseca pero con afinidad por los receptores de un cierto agonista) no muestra efectos en un órgano aislado, pero puede mostrar efectos en el organismo. En condiciones fisiológicas, muchos sistemas receptor-efector son activados como resultado de la presencia de un agonista endógeno (el sistema receptor-efector es el conjunto completo de receptores de un tipo, más la cadena de eventos celulares que conducen a un efecto). Si administramos un fármaco que bloquea el efecto de ese agonista endógeno se alterará la respuesta de este. Por ejemplo si administramos un colirio con atropina en un ojo, la pupila se dilata por bloqueo de los receptores de la acetilcolina secretada por las fibras parasimpáticas que normalmente contraen el músculo circular de la pupila. La atropina es un antagonista competitivo porque se opone a la acción agonística de la acetilcolina con afinidad por el mismo receptor y sin actividad intrínseca.

En los capítulos siguientes exploraremos los mecanismos intracelulares de agonistas y antagonistas con acción en los diferentes tipos de músculos, por constituir sistemas básicos de estudio de acción de fármacos. En un capítulo sucesivo retomaremos estos conceptos para analizar la Farmacología cuantitativa.

En los siguientes capítulos estudiaremos los principios de las pruebas “in vivo” en animales de laboratorio para caracterizar efectos en el sistema nervioso central de los fármacos. Después ahondaremos en los fundamentos de los estudios de bioseguridad de un fármaco a realizar cuando es un posible candidato al uso terapéutico.

Finalmente, comprenderemos el origen farmacocinético y farmacodinámico de las interacciones que se producen entre dos o más medicamentos que pueda estar tomando un paciente, para aprender a reconocerlos y prevenirlos en nuestra tarea como integrantes del equipo de Salud.

Solo queda desearles que este Libro de Cátedra les resulte ameno y clarificador de las dudas y preguntas que suelen surgir al iniciar el estudio de la Farmacología.

## Referencias

- Anmat-Iname (2007). *Farmacopea Argentina*. 8ª Edición. Buenos Aires: Comisión permanente de Farmacopea.
- Kenakin, T.P. (1984). “The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues”. En *Pharmacological Reviews*, 36(3), (pp. 165-222).
- Velazquez (2008). *Farmacología básica y clínica*. 18ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana.

# CAPITULO 1

## Farmacodinamia del músculo esquelético

*María Inés Ragone y Alicia Elvira Consolini*

*Aprender es como remar contra la corriente:  
en cuanto se deja, se retrocede*

EDWARD BENJAMIN BRITTEN

La contracción del músculo esquelético es la resultante de un complejo mecanismo fisiológico en el que se distinguen las siguientes etapas:

### **Transmisión neuromuscular**

El control sobre el tono del músculo esquelético por parte del sistema nervioso periférico se logra principalmente a través de las actividades de los nervios somáticos. La influencia que controla a los nervios somáticos es la corteza motora a través del tracto piramidal hasta la neurona motora inferior ( $\alpha$ -motoneurona) constituyendo esto la vía neuronal final que llega al músculo. Cada neurona motora atraviesa sin interrupción el cuerpo ventral de la médula espinal como un gran axón mielinizado. Cuando el nervio se acerca a las fibras musculares, se desdobra en varias ramas para ponerse en contacto con el músculo e inervar muchas fibras musculares individualmente. Estas terminaciones nerviosas, donde se encuentra la acetilcolina (Ach) almacenada en vesículas forman una unidad funcional conocida como unión neuromuscular, unión mioneural o placa motora terminal (Figura 1) La unión neuromuscular es una unidad especializada para transmitir y recibir señales químicas tanto del lado del nervio como del lado del músculo esquelético (Sanes y col., 2001). La neurona motora pierde su mielina y se subdivide hacia su extremo en muchos botones pre sinápticos para culminar sobre la superficie de la fibra de músculo. Esta terminal sináptica, cubierta por células de Schwann, tiene vesículas arracimadas que contienen neurotransmisor (Ach) congregadas sobre los espesamientos de la membrana hacia su lado sináptico, mientras que el micro-túbulos, mitocondrias, y otras estructuras de apoyo, son localizados hacia el lado distal (Cohen-Cory S, 2002). Existen al menos dos "pools" de vesículas que liberan Ach: uno fácilmente liberable y otro que actúa como fondo de la reserva. El primero está formado por vesículas un poco más pequeñas y son

las que limitan una zona muy cerca de la membrana del nervio conocida como “zona activa”. Estas vesículas son las que liberan neurotransmisor hacia la hendidura sináptica cuando llega el potencial de acción (Sudhorf TC, 2006; Lang & Jahn, 2008).

La superficie de músculo es un área acanalada y densa formada por pliegues que contienen receptores de acetilcolina. Enzimas como acetilcolinesterasa (AChE) y otras proteínas incluidas glicoproteínas necesarias para la estabilidad de la unión neuromuscular se encuentran presentes en las hendiduras sinápticas.

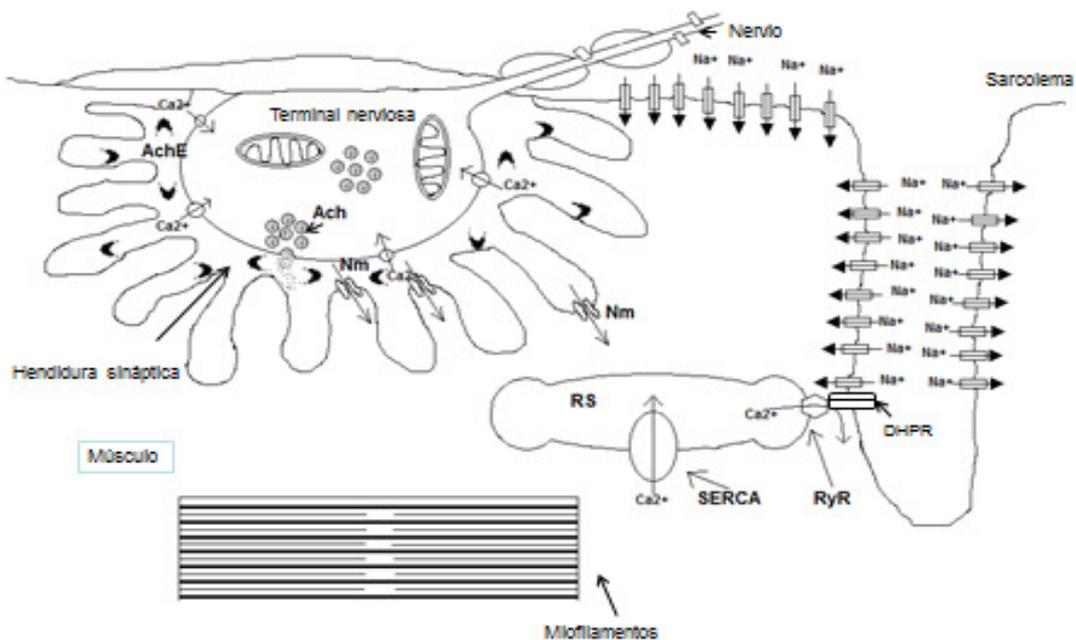


Figura 1: Esquema de la estructura de la unión neuromuscular.

Ach: actilcolina; AchE: acetilcolinesterasa; Nm: receptor nicotínico muscular; RS: retículo sarcoplásmico; SERCA:  $Ca^{+2}$  ATPasa del RS; RyR: receptor de rianodina; DHPR: receptor de dihidropiridinas

Cuando una despolarización, en forma de potencial de acción nervioso (PA) llega a la terminal nerviosa, los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje que hay en ella se activan y permiten la entrada de  $Ca^{2+}$  en el interior del botón sináptico. Esta entrada de  $Ca^{2+}$  produce un aumento de la  $[Ca^{2+}]$  intracelular y como consecuencia de esto varios cientos de vesículas que contienen ACh se aproximan y se fusionan a la membrana, produciéndose así la liberación sincrónica de neurotransmisor hacia la hendidura sináptica (mecanismo de exocitosis). Bajo condiciones de reposo (la ausencia de un potencial de acción de nervio en el terminal de nervio distal), existen pequeños potenciales espontáneos de placa terminal conocidos con el nombre de potenciales miniatura que pueden ser registrados en el lado postsinápticos de la unión neuromuscular. Estos potenciales son el resultado de la liberación de un pequeño número de vesículas que contienen ACh (Cohen-Cory S, 2002).

Existen sustancias tales como algunas toxinas bacterianas que interfieren en el mecanismo de exocitosis antes descrito. Las toxinas producidas por especies como el *Clostridium* que incluyen la toxina botulínica y la tetánica, bloquean la exocitosis de las vesículas de Ach (Turton y col., 2002). Esta acción trae como consecuencia debilidad muscular o parálisis del mismo dependiendo la dosis utilizada. La toxina botulínica es usada terapéuticamente para tratar la espasticidad en varias enfermedades neurológicas y quirúrgicas, para reducir la sudación excesiva, y en la industria cosmética para corregir arrugas (Schurch B, 2004; Lowe, 2007).

Una vez que la Ach es liberada desde la terminal nerviosa al espacio sináptico, este neurotransmisor se une con el receptor nicotínico en la membrana postsináptica despolarizándola y generando un potencial de acción en la fibra muscular. La propagación del potencial de acción a lo largo de la membrana postsináptica conduce a la liberación de calcio dentro del músculo.

Este receptor postsináptico, al cual se une Ach, recibe el nombre de acetilcolínico nicotínico porque es estimulado tanto por la acetilcolina (neurotransmisor) como por la nicotina (alcaloide) y pertenece a una familia de conductos iónicos controlados por ligando. Existen diversos subtipos de dichos receptores tanto en la unión neuromuscular (receptor nicotínico muscular) como en los ganglios (receptor nicotínico ganglionar o neuronal). El tipo muscular es el que se encuentra en el músculo estriado de vertebrados mediante la transmisión neuromuscular mientras que los ganglionares se encuentran en los ganglios y en el SNC.

Los receptores nicotínicos son canales iónicos pentámericos con compuerta de ligando, la combinación de dos moléculas de ACh con estos receptores al nivel de la superficie externa de la membrana postsináptica induce un incremento notable inmediato en la permeabilidad celular al  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Al activar la ACh al receptor, se abre su canal intrínseco durante cerca de 1 ms; durante este intervalo atraviesan el canal cerca de 50.000 iones de  $\text{Na}^+$  (Figura 2). El proceso de apertura de canales es la base para el potencial despolarizante dentro de la placa motora, que desencadena el potencial de acción muscular. Este último, a su vez, produce contracción. En particular existen dos tipos de receptores nicotínicos musculares: el fetal  $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$  y el adulto  $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$  y ambos requieren dos moléculas de Ach para su activación. (Goldman y col., 1988)

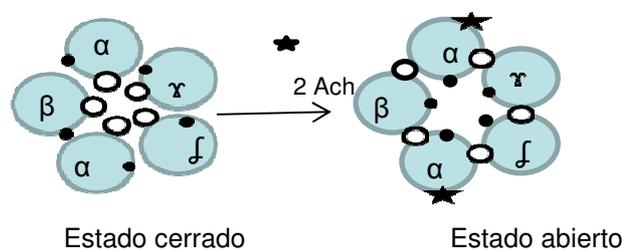


Figura 2: Esquema del receptor nicotínico muscular en estado cerrado y en estado abierto

Para que la Ach actúe como neurotransmisor en el sistema motor y en otras sinapsis neuronales, debe ser eliminada o inactivada dentro de los límites cronológicos impuestos por las características de respuesta de la sinapsis. En la unión neuromuscular se necesita la eliminación inmediata para evitar la difusión lateral y la activación seriada de receptores vecinos. El exceso de Ach es rápidamente inactivado por hidrólisis por la AchE (acetilcolinesterasa) que se encuentra en la superficie de la membrana postsináptica. El tiempo necesario para la hidrólisis de la acetilcolina en la unión neuromuscular es menor de 1 ms. (Sanes & Lichtman, 1999).

## **Acoplamiento excito-contráctil**

Se denomina acoplamiento excito-contráctil al proceso por el cual la despolarización del músculo inicia la contracción. El potencial de acción se transmite por corrientes de  $\text{Na}^+$  en sentido transversal a todas las miofibrillas a través del sistema T. Este sistema de túbulos dependiente de la membrana celular toma contacto con la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) formando una triada originada por el sarcolemma, y dos cisternas del RS. Recientemente, se ha encontrado que la interacción directa entre dos proteínas: una transmembrana localizada sobre la parte longitudinal del RS (Ank1) y otra miofibrilar (obscurita) causan los contactos moleculares que tienden a estabilizar las estructuras tubulares del RS a lo largo de las miofibrillas en el músculo esquelético (Barone y col., 2015).

Cuando la despolarización llega al RS se produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . El acoplamiento excito-contráctil en el músculo esquelético de vertebrados ocurre por un mecanismo mediado por una interacción proteína – proteína entre el receptor de rianodina (RyR1) del RS con el receptor de dihidropiridina (DHPR). El DHPR actúa como un sensor de voltaje capaz de cambiar su conformación con los cambios de voltajes que ocurren en el túbulo transversal o túbulos T y de esta manera activar al RyR1 presente en el RS a través de una interacción directa que tiene como consecuencia final la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. En cambio el RyR es un canal de  $\text{Ca}^{+2}$  de alta conductancia, siendo el responsable de la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  que activa la contracción muscular en todas las fibras de músculo estriado.

La interacción entre DHPR y RyR está estabilizada por una serie de proteínas y juega un rol fundamental en el acoplamiento excito-contráctil en el músculo esquelético. El DHPR interacciona con el RYR por medio de la unión de al menos una de sus regiones citoplasmáticas con el músculo permitiendo así la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta interacción puede ser modificada por la fosforilación del DHPR mediada por proteínas quinasas dependientes de AMPc (Meissner & Lu, 1995) (Figura 3).

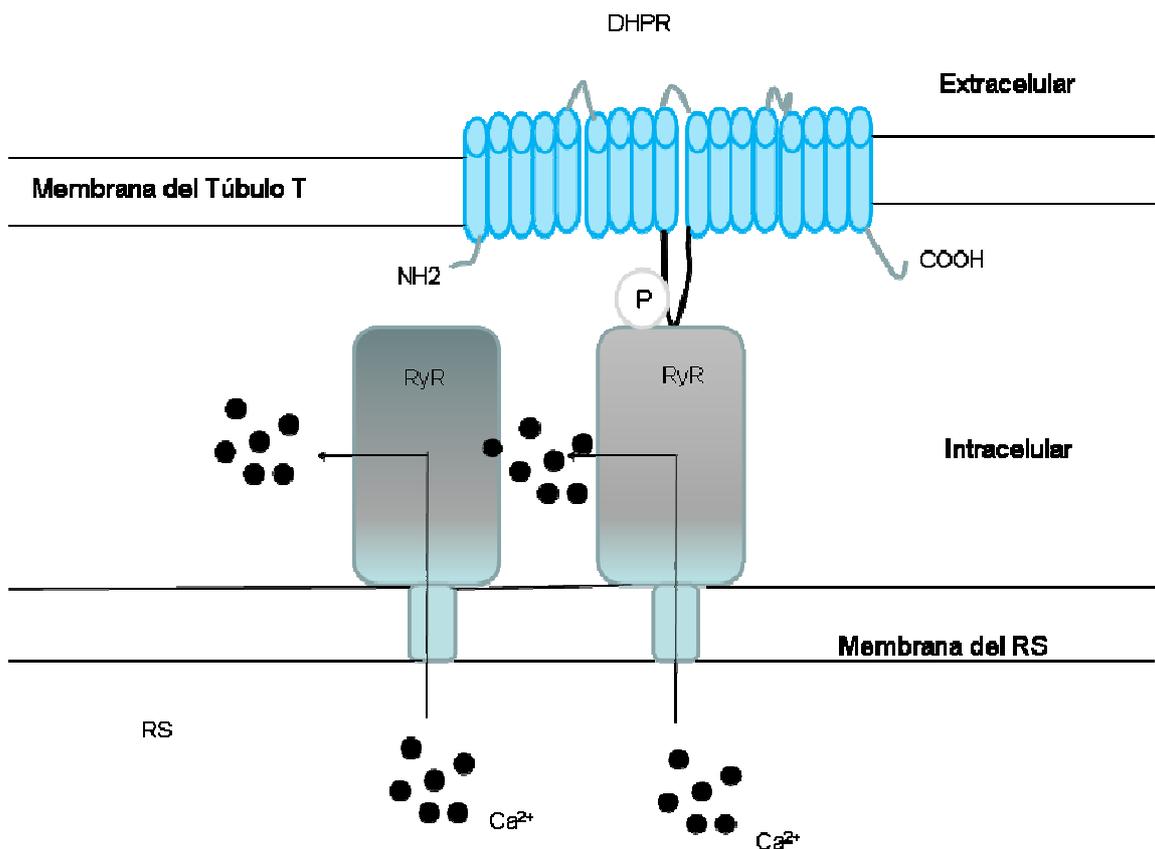


Figura 3: Esquema de la interacción DHPR- RyR. Adaptado de Meissner & Lu, 1995

En una etapa posterior, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  es amplificada por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, este proceso está mediado por activación de canales que no están unidos a los de DHPR. El  $\text{Ca}^{2+}$  es el activador final del proceso que vincula la excitación de la membrana con el comienzo de la contracción muscular. El músculo esquelético depende exclusivamente del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para contraerse.

En un nivel de reposo de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  la tropomiosina bloquea estéricamente el sitio activo de la actina, y en consecuencia, la adherencia de la cabeza de miosina. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se eleva, se une a la troponina C (TnC). La interacción del  $\text{Ca}^{2+}$  con la troponina C suspende la inhibición que la troponina I y la tropomiosina ejercen sobre la interacción actina-miosina, lo que permite que la tropomiosina se desplace del sitio activo de la actina que rápidamente se une a las cabezas de miosina iniciándose la contracción muscular por hidrólisis del ATP (Lamb GD, 2000). El ATP es hidrolizado a ADP y compuestos de fosfato inorgánico de alta energía ( $\text{P}_i$ ) quedando estos productos de hidrólisis ligados al sitio activo de la miosina. Consecuentemente el paso crítico para el acoplamiento excito contráctil es la generación de fuerza por la unión de la cabeza de miosina al filamento de actina formando lo que se conoce con el nombre de "cross-bridge". Esta reacción exotérmica brinda energía para la formación de un ángulo en la cabeza de miosina que desencadena el corrimiento acto-

miosínico. El proceso es totalmente reversible en condiciones de producción de ATP; éste ATP reemplaza al ADP remanente para iniciar otro ciclo de acortamiento actomiosínico. La figura 4 resume de forma esquemática las etapas descritas anteriormente.

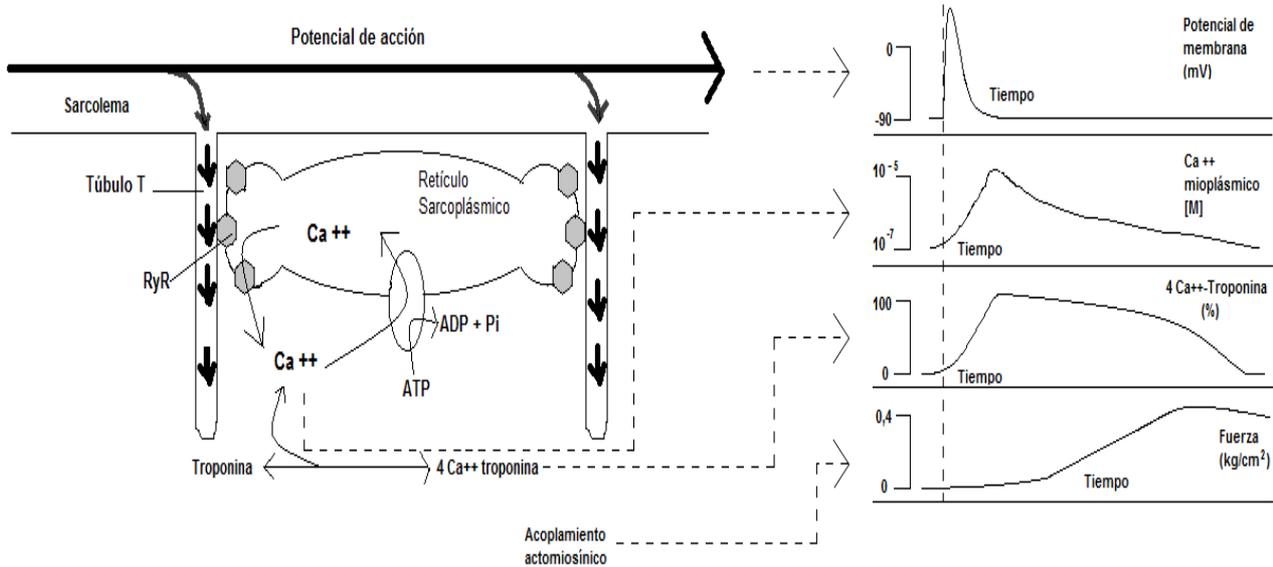


Figura 4: Representación esquemática del acoplamiento excito-contráctil.

Por el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  se produce también la unión de éste a las CaATPasas del retículo sarcoplásmico, iniciándose la recaptación, la cual predomina por sobre la liberación de  $Ca^{2+}$  durante la repolarización. En consecuencia, se desencadena la relajación muscular ya que desciende el nivel de  $Ca^{2+}$  en los miofilamentos y el  $Ca^{2+}$  se disocia de sus sitios de fijación sobre la troponina. La tasa de remoción de  $Ca^{2+}$  citoplásmico es, aproximadamente, de  $50 \mu\text{moles/ms}$  y es amortiguado inicialmente por proteínas solubles citoplásmicas como la parvalbúmina y, finalmente, recapturado por la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (SERCA) (Yu & Catterall, 2003). La parvalbúmina es una proteína monomérica de 12 kDa, que une  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  con alta afinidad y tiene un papel importante en la relajación de los músculos rápidos. Mientras que las proteínas citosólicas manejan el  $Ca^{2+}$  de manera transitoria con una cinética rápida, la SERCA retorna el  $Ca^{2+}$  a su interior con una cinética más lenta. (Lamb GD, 2000).

Experimentos realizados en microsomas del RS de músculo esquelético muestran que el derivado benzotiazinico: CGP-37157 usado comúnmente para bloquear el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  mitocondrial inhibe la actividad de la SERCA con una  $CE_{50}=9.9 \text{ M}$  y activa los canales de RyR con una  $CE_{50}=12.0 \text{ M}$ . (Neumann y col., 2011).

## Drogas que actúan en el músculo esquelético

### a) Drogas con acción agonista nicotínica muscular

Los estimulantes de los receptores de Ach comprenden a un grupo numeroso de fármacos que la imitan. Los efectos de la **Ach** cubren una amplia variedad de actividades dependiendo del tipo de receptor activado: muscarínico o nicotínico. Los *análogos de Ach* pueden dividirse en dos grandes grupos: 1) *ésteres sintéticos* y 2) *alcaloides colinomiméticos naturales*.

Dentro del primer grupo, la **metacolina** (éster de colina) se diferencia de la Ach por su acción más duradera y selectiva. Esta acción más prolongada es debido a la resistencia a la hidrólisis por las colinesterasas que le confiere el grupo metilo adicional. Si bien posee predominio de acciones muscarínicas también posee acciones nicotínicas leves.

Por su parte el **carbacol** y el **betanecol**, ésteres de carbamoilo no sustituidos de Ach, son totalmente resistentes a la hidrólisis por las colinesterasas. Mientras que el **betanecol** posee predominantemente acciones muscarínicas, el **carbacol** conserva importante actividad nicotínica además de muscarínicas.

Los tres alcaloides naturales principales de este grupo: pilocarpina, muscarina y arecolina, tienen los mismos sitios principales de acción que los ésteres de colina que se han descrito. Sin embargo solo la **arecolina** actúa también al nivel de los receptores nicotínicos.

En la figura 5 se muestran los registros fuerza de contracción obtenidos en laboratorio en recto abdominal de batracio aislado mediante el agregado de dos agonistas nicotínicos musculares, observándose una contracción lenta y sostenida característica de este músculo.

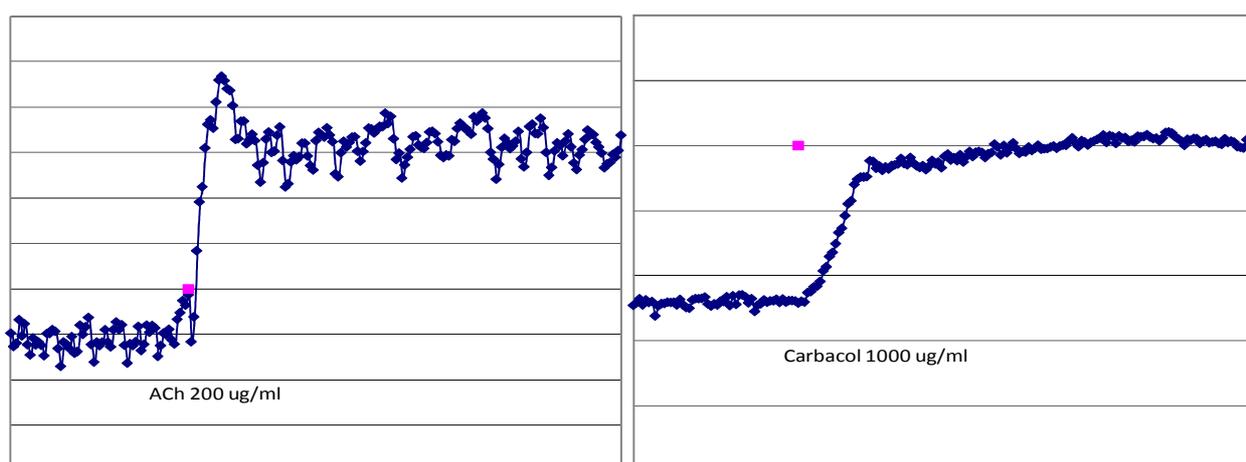


Figura 5: Registro de fuerza de contracción vs tiempo obtenidos por el agregado de Ach (izquierda) y carbacol (derecha) en un preparado "ex vivo" de recto abdominal de batracio

## b) Agentes bloqueantes neuromusculares

Los fármacos que actúan bloqueando la unión neuromuscular se clasifican en dos grandes grupos: *bloqueantes nicotínicos competitivos* y *bloqueantes nicotínicos despolarizantes*.

### b) i) **Bloqueantes nicotínicos competitivos (d-tubocurarina y demás derivados del curare)**

Son antagonistas del receptor nicotínico, se combinan con el receptor nicotínico en la placa terminal y compiten con la Ach por la unión a este, pero no presentan actividad intrínseca. Cuando se aplica directamente el fármaco en la placa terminal de una sola fibra muscular aislada, la célula muscular se vuelve insensible a los impulsos del nervio motor y a la Ach aplicada directamente, sin embargo la región de la placa terminal y el resto de la membrana de la fibra muscular retienen sus sensibilidades normales a la estimulación eléctrica directa (Goodman & Gilman, 2014).

Estos fármacos causan parálisis flácida del músculo esquelético dado que ante un nuevo impulso del nervio motor el músculo esquelético no puede contraerse (disminuye la amplitud del PPT de manera tal que no llega al umbral para la iniciación de un PA propagado, ver Figura 6 a).

Los *bloqueantes nicotínicos competitivos* se pueden clasificar de acuerdo al tiempo de acción del fármaco. A saber: bloqueantes de *acción prolongada, intermedia o breve*.

En muchos casos, los agentes de acción prolongada son los más potentes, por lo que se requiere su uso a concentraciones bajas. La necesidad de administrar estos compuestos a concentraciones reducidas retrasa el inicio de su actividad. En este grupo encontramos drogas como **d-tubocurarina, metocurina, pancuronio y doxacurio**, las cuales producen un bloqueo persistente y por ende presentan dificultad para la reversión completa después de intervención quirúrgica.

El **vecuronio, atracurio y rocuronio** por su parte son compuestos de duración intermedia. En particular el rocuronio presenta además un inicio de acción rápido y potencia baja, es por esto que a menudo es utilizado para relajar los músculos laríngeos y maxilares y facilitar así la intubación traqueal.

A esto fármacos le siguió la síntesis del agente de acción breve **mivacurio**. Este último derivado es eliminado del organismo mediante hidrólisis de colinesterasas plasmáticas la cual es independiente de la función renal del paciente (Goodman & Gilman, 2014).

Dado que estos fármacos son bloqueantes competitivos del receptor nicotínico muscular, su acción puede ser revertida mediante el aumento de las concentraciones de Ach en la unión neuromuscular. Este efecto puede lograrse mediante la utilización de fármacos antiche como fisostigmina (Figura 6b).

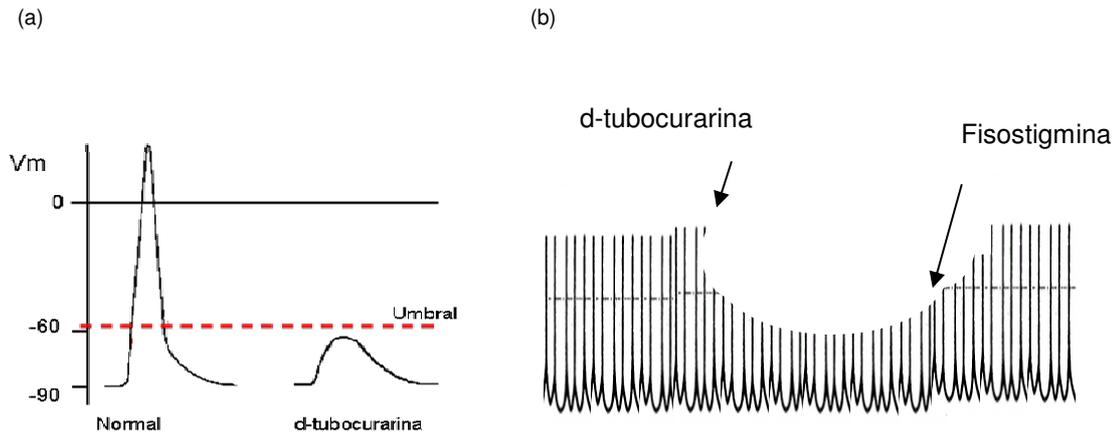


Figura 6: (a) Potencial de placa terminal normal y con dTC. (b) Reversión con fisostigmina de la acción de dTC sobre la fuerza de contracción en el recto abdominal de batracio estimulado eléctricamente.

En este aspecto, en la Figura 7 se muestra la acción del pancuronio en un músculo esquelético aislado sin estímulo eléctrico (recto abdominal de batracio). Este fármaco bloquea competitivamente los receptores nicotínicos musculares de forma tal que para revertir este bloqueo es necesario el agregado de dos dosis sucesivas de carbacol.

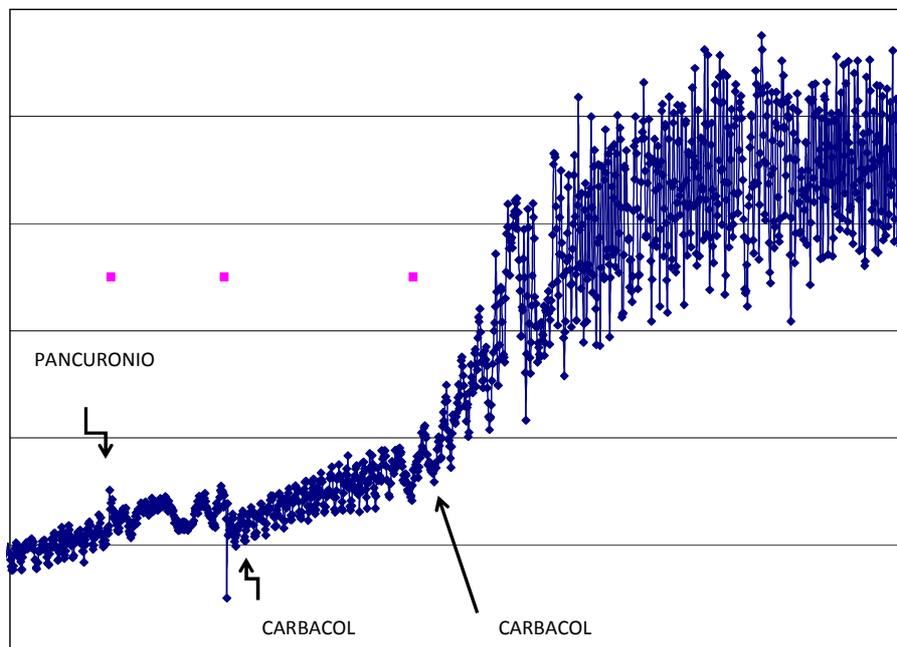


Figura 7: Actividad de pancuronio en el músculo esquelético: registro de fuerza de contracción en recto abdominal de batracio

Aunque en particular, la **tubocurarina** bloquea con eficacia la transmisión, tanto al nivel de las placas motoras terminales como de los ganglios autónomos, predomina su acción sobre el primer sitio lo que le confiere su propiedad de relajante muscular del músculo esquelético. Por ello, estos fármacos son utilizados en terapéutica como coadyuvantes en procedimientos quirúrgicos que impliquen el uso de anestesia general. El bloqueo de transmisión neuromuscular es un rasgo importante durante la anestesia y el tratamiento de cuidado intensivo de pacientes, dado que permite disminuir las dosis de anestésicos a utilizar y por ende aminorar los efectos adversos que pueden ocasionar los mismos. La selección terapéutica de estos agentes bloqueantes nicotínicos competitivos como coadyuvantes de la anestesia debe orientarse a lograr un espectro farmacocinético compatible con la duración del procedimiento por efectuar (Velázquez, 2008). Dado que los agentes de bloqueo neuromuscular son fármacos potencialmente peligrosos sólo deben ser aplicados por anesthesiólogos y en condiciones de fácil acceso a medios para una eventual reanimación cardiovascular y/o respiratoria.

### **Metabolismo y eliminación de agentes bloqueantes neuromusculares**

La mayoría de los bloqueantes neuromusculares sufren eliminación renal, metabolismo y depuración hepática. Sin embargo, algunos de ellos como el *mivacurio* son metabolizados sólo por acción de la butirilcolinesterasa, lo que constituye una vía alternativa en pacientes que poseen su función renal disminuida. La diferencia en duración de acción de estos bloqueantes es debida en gran medida a la diferencia en la sensibilidad de los mismos frente a la actividad de las butirilcolinesterasas. En la tabla 1 se muestra el modo de eliminación de los bloqueantes neuromusculares competitivos clasificados de acuerdo a su duración de acción.

**Tabla 1: Clasificación de los bloqueantes neuromusculares competitivos de acuerdo a su duración de acción y comparación del modo de eliminación de los mismos**

<b>Fármaco bloqueante neuromuscular competitivo</b>	<b>Modo de eliminación</b>	
Larga duración de acción	d-tubocurarina	Eliminación renal, depuración hepática
	Pancuronio	Eliminación renal, metabolismo y depuración hepática
	Doxacurio	Eliminación renal, metabolismo y depuración hepática
Breve duración de acción	Mivacurio	Hidrólisis por colinesterasas plasmáticas
Duración de acción intermedia	Atracurio	Hidrólisis por colinesterasas plasmáticas e hidrólisis espontáneas
	Rocuronio	Metabolismo hepático y depuración renal
	Vecuronio	Metabolismo y depuración hepática; eliminación renal

## Propiedades farmacológicas adicionales al bloqueo neuromuscular de los bloqueantes neuromusculares competitivos

Los agentes bloqueantes neuromusculares competitivos no poseen efectos centrales dada su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, sin embargo algunos de ellos pueden producir bloqueo ganglionar o muscarínico con potencia variable ocasionando en el paciente una caída en la presión arterial y taquicardia (Habre y col., 2008). El mivacurio, rocuronio y atracurio son los congéneres más selectivos por lo que su uso permite mantener las reacciones cardiovasculares reflejas durante la anestesia (Goodman & Gillman, 2014).

Tubocurarina y sus congéneres mivacurio y atracurio en menor medida, pueden producir descarga de histamina por un efecto directo del fármaco en el mastocito ocasionando efectos adversos como broncoespasmo, hipotensión, secreción bronquial y salival aumentada (Watkins, 1994).

### b)ii) Agentes despolarizante neuromusculares

Los agentes despolarizantes como la **succinilcolina** o el **decametonio** despolarizan la membrana al inicio de su actividad al agonizar los receptores nicotínicos musculares de manera similar a la Ach. Sin embargo, dado que estos agentes son más resistentes a la acción de la acetilcolinesterasa persisten por más tiempo en la unión neuromuscular. Por lo tanto, la despolarización es más prolongada y da por resultado un breve período de excitación repetitiva que puede desencadenar una excitación muscular transitoria y repetitiva (fasciculaciones) la cual es seguida por el bloqueo de la transmisión neuromuscular y parálisis flácida (denominada bloqueo de fase I). Este bloqueo es originado por la incapacidad de los canales de sodio de volver a abrirse hasta que se repolarice la placa terminal y por ende su acción no puede ser revertida por un antiche como la fisostigmina (ver fig. 8b). En este punto la liberación neural de la Ach da por resultado la unión de Ach a los receptores en una placa terminal ya despolarizada (figura 8 a).

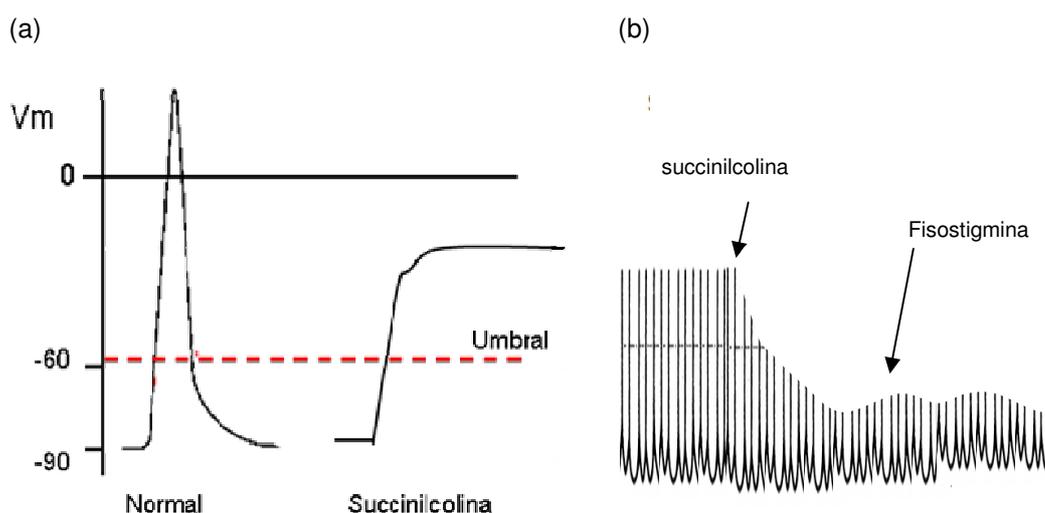


Figura 8: (a) Potencial de placa terminal normal y con succinilcolina. (b) Reversión con fisostigmina de la acción de succinilcolina sobre la fuerza de contracción en el recto abdominal de batracio estimulado eléctricamente

La *succinilcolina* es el único de estos agentes utilizado en clínica y es administrada para facilitar la intubación traqueal por relajar los músculos laríngeos y maxilares (Bevan, 1994). Su inicio de acción es más rápido que otros relajantes no despolarizantes, su tiempo de duración de acción es corto (6 a 8 minutos) y su eliminación esta mediada por la acción de pseudocolinesterasas por ende es independiente de la función renal del paciente. El inicio de acción de su actividad es dosis dependiente y dosis elevadas pueden producir parálisis generalizada del paciente (Goodman & Gillman, 2014).

Dentro de los efectos adversos más frecuentes que puede presentar el paciente con el tratamiento con succinilcolina se encuentran dolor posoperatorio, hiperpotasemia y aumento de la presión intraocular. En casos más graves y con menor frecuencia de aparición existe el riesgo de parálisis respiratorio o de hipertermia maligna.

El efecto secundario muscular ha limitado el uso de la succinilcolina como fármaco preoperatorio. Este efecto se manifiesta por el aumento súbito en el suero de creatina kinasa. En estudios clínicos recientes se ha encontrado que el tratamiento previo a succinilcolina con un bloqueante nicotínico muscular no despolarizante como el rocuronio disminuye significativamente los niveles de creatina kinasa y por ende el efecto no deseado del fármaco despolarizante sobre el músculo esquelético (Farhat y col., 2013).

En algunos pacientes se ha manifestado apnea prolongada post administración de succinilcolina debido en la mayoría de los casos a la presencia de colinesterasas plasmáticas atípica o deficiencia de esta enzima (Goodman & Gillman, 2014).

### c) Agentes anticolinesterásicos

Los fármacos anticolinesterásicos o AntiChE, prolongan la permanencia de la Ach en las uniones neuromusculares al inhibir a la AchE (acetilcolinesterasa), esto permite que el neurotransmisor se fije de nuevo a receptores múltiples. La estimulación sucesiva mediante difusión al nivel de los receptores vecinos da por resultado prolongación del tiempo de desaparición del potencial de la placa terminal. La AchE posee tres dominios definidos para ligandos inhibidores: el saco acilo del centro activo, el subsitio de la colina sobre el centro activo y el sitio aniónico periférico.

La distinta velocidad de regeneración de la AchE después del tratamiento con los diferentes fármacos anticolinesterásicos lleva a denominarlos como **reversibles** (alcoholes simples y derivados carbámicos como el **edrofonio**, **fisostigmina**, **neostigmina** entre otros) e **irreversibles** (compuestos organofosforados) (Velázquez, 2012). En la figura 9 se muestran los mecanismos de inhibición de la AchE reversible e irreversible.

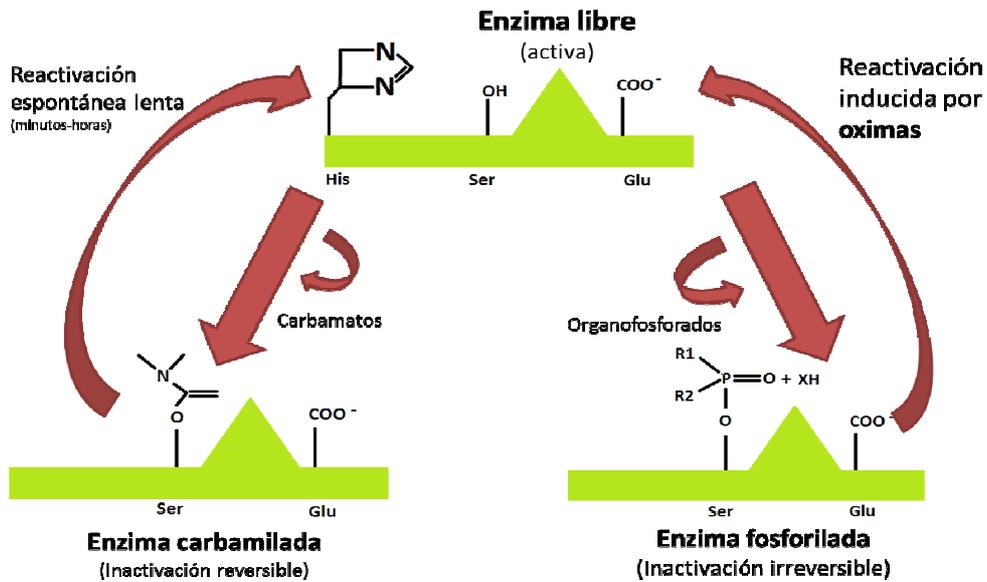


Figura 9: Mecanismos de inhibición y reactivación de la acetilcolinesterasa

Los agentes anti-ChE pueden producir:

- Estimulación indirecta de los receptores muscarínicos al nivel de los órganos efectores autónomos por aumentar el tiempo de permanencia de Ach en las sinapsis colinérgicas.
- Estimulación de todos los ganglios autónomos y del músculo estriado por aumentar el tiempo de permanencia de Ach tanto a nivel de los receptores nicotínicos ganglionares como musculares.
- Estimulación indirecta de los sitios receptores colinérgicos en el SNC.

En esta sección nos centraremos en la acción de los agentes anticolinesterásicos a nivel del músculo esquelético.

En la figura 10 se muestra un registro obtenido en recto abdominal de batracio. En el mismo puede observarse el aumento en la fuerza de contracción de dicho músculo cuando se administra fisostigmina antes del agregado de Ach.

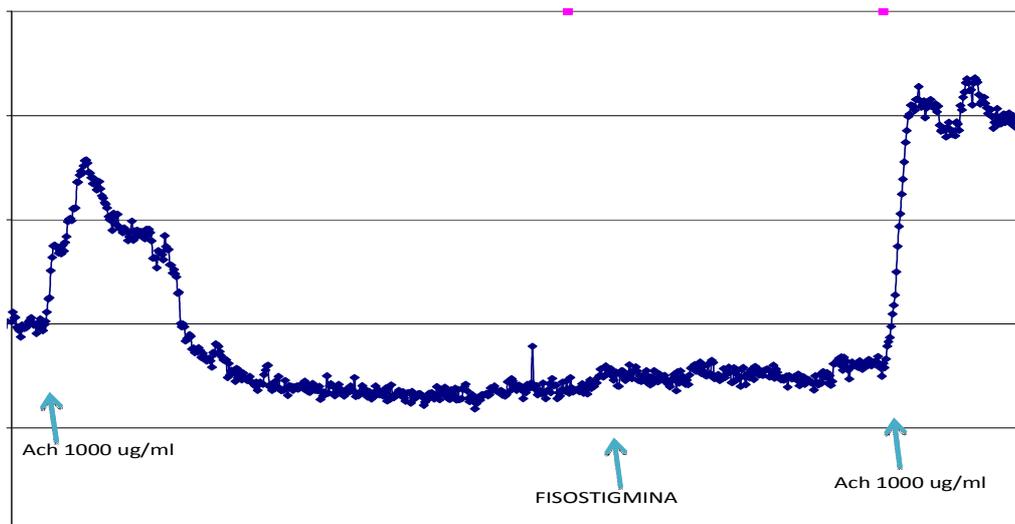


Figura 10: Acción de fisostigmina en músculo esquelético. Registro de fuerza de contracción en recto abdominal de batracio sin estímulo eléctrico

En general, los compuestos que contienen un grupo de amonio cuaternario no penetran por las membranas celulares con facilidad; de ahí que las drogas anti-ChE de esta categoría tales como **nesotigmina** se absorban mal por el tubo digestivo o por la piel, y sean excluidas del SNC por la barrera hematoencefálica después de administrarse a dosis moderadas. Por otra parte, estos compuestos actúan de preferencia en las uniones neuromusculares del músculo estriado y ejercen una doble acción, como agentes anti-ChE y como agonistas directos del receptor nicotínico muscular a diferencia de otros anti-ChE como la *fisostigmina* (Figura 11). Por otra parte, estos fármacos tienen un efecto relativamente menor en los sitios efectores autónomos y ganglionar.

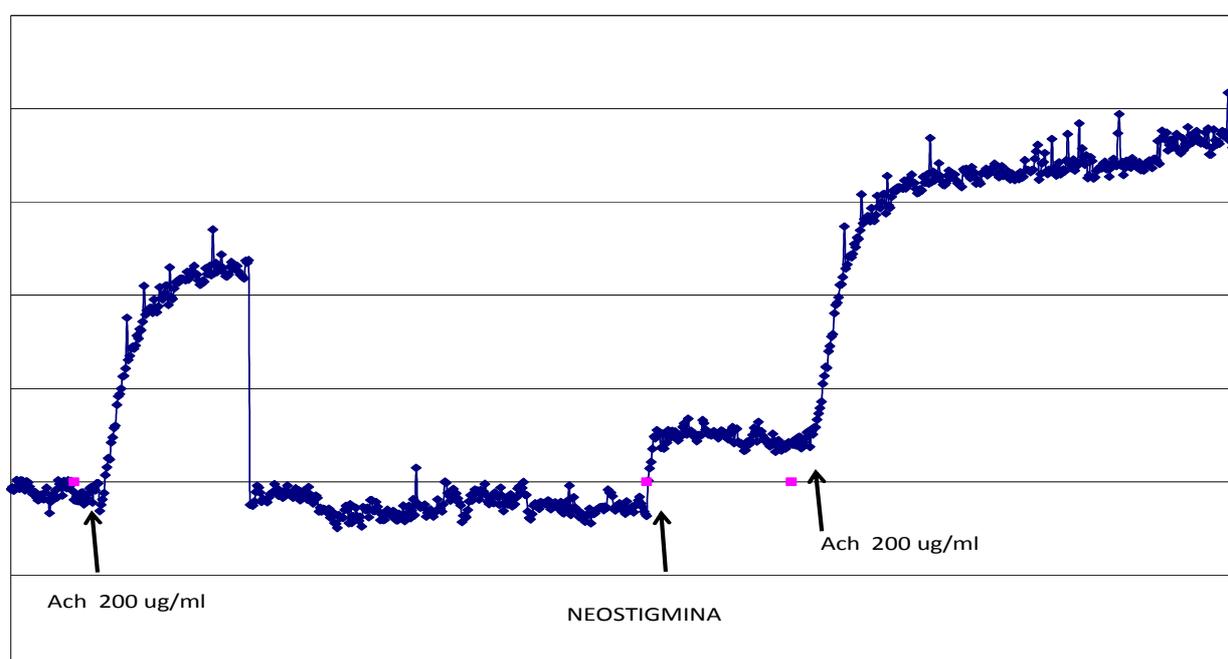


Figura 11: Acción de neostigmina en músculo esquelético. Registro de fuerza de contracción en recto abdominal de batracio sin estímulo eléctrico

Las acciones antes descritas les brinda dos utilidades terapéuticas principales: tratamiento de la "miastenia gravis" (ver sección posterior: Diagnóstico y tratamiento de Miastenia gravis) y la posibilidad de reversión de una intoxicación con agentes curarizantes. Ej.: fisostigmina, neostigmina, piridostigmina.

En contraste, los compuestos más liposolubles tales como los *compuestos organofosforados* como el *malatión* se absorben por vía oral y generan efectos tanto en los receptores colinérgicos periféricos como centrales y pueden quedar secuestrados en lípidos durante periodos prolongados (Storm y col., 2000). Estas propiedades le confieren toxicidad a este grupo de compuestos, la misma depende del tipo de compuesto y sus efectos farmacológicos varían de acuerdo al grado de toxicidad y vía de entrada en el organismo (inhalación, ingestión o percutánea). Las intoxicaciones con compuestos organofosforados pueden generar tres cuadros clínicos diferentes: la intoxicación aguda, un síndrome intermedio y una neurotoxicidad tardía.

El cuadro de intoxicación aguda genera un conjunto de signos y síntomas denominados síndrome colinérgico caracterizado por cambios en el estado de conciencia, debilidad muscular y excesiva actividad secretora. La aparición de este cuadro varía entre pocos minutos hasta doce horas posterior al contacto con el tóxico y depende de variables como: la edad del paciente, la cantidad ingerida y la toxicidad intrínseca del organofosforado. En particular, en niños los efectos nicotínicos se observan con mayor frecuencia que en los adultos. El tratamiento inicial es un tratamiento de sostén respiratorio mecánico, una descontaminación adecuada según la vía de entrada del tóxico y un manejo específico de la intoxicación mediante la administración de *atropina* para el control de los efectos muscarínicos y *pralidoxima* (oxima) que actúa mediante la reactivación de la acetilcolinesterasa eliminando su grupo fosfato y permitiendo la regeneración de la de esta enzima (Figura 9) (Fernández y col., 2010).

Posterior a una dosis de un compuesto organofosforado la administración intravenosa de pralidoxima reestablece notablemente la reacción a la estimulación del nervio motor en un tiempo de algunos minutos. Si bien a dosis muy altas la pralidoxima puede producir bloqueo neuromuscular, esto no ocurre a las dosis recomendadas para el tratamiento de intoxicaciones. De todos modos, cuando la infusión de este antídoto es rápida el paciente puede sufrir efectos adversos tales como debilidad leve, visión borrosa, mareos, diplopía, cefalalgia, náuseas y taquicardia (Goodman & Gilman, 2014).

### **Diagnóstico y tratamiento de Miastenia gravis**

La miastenia gravis (MG) está desencadenada por un defecto en la neurotransmisión sináptica neuromuscular debido a la reducción en los receptores nicotínicos por la reacción de anticuerpos específicos contra estos receptores. Clínicamente se caracteriza por fatiga y debilidad de músculo (Morrison BM, 2016).

El diagnóstico en la mayoría de los casos depende del reconocimiento de manifestaciones clínicas. Sin embargo, es indispensable diferenciar esta patología de otras enfermedades neurasténicas, infecciosas o neoplásicas. En este aspecto la MG es el único padecimiento de este tipo que mejora los síntomas y signos con la acción de fármacos anticolinesterásicos (Drachman DB, 2016). La prueba de edrofonio (anticolinesterásico) se utiliza para confirmar diagnóstico de MG. Esta prueba consiste en la inyección intravenosa rápida de 2 mg de cloruro de edrofonio. Luego de la inyección se evalúa mejoría de la fuerza como respuesta positiva a MG. Si 45 segundos después de la primera dosis no hubo efecto se realiza una administración adicional de 8 mg y se reevalúa la respuesta (Goodman & Gillman, 2014).

En la actualidad existen otros elementos de diagnóstico que involucran: medida de anticuerpos en plasmas o la identificación de dichos anticuerpos en biopsias musculares (Lee & Jander, 2016).

El tratamiento clásico de la MG implica el aumento de la transmisión neuromuscular por fármacos anticolinesterásicos como *piridostigmina* o *neostigmina* que preservan la Ach endógena. Mientras que en situaciones donde sea necesario alcanzar una mejoría rápida se puede administrar inmunoglobulina intravenosa; la terapia con inmunosupresores (inhibidores de cal-

cineurina o glucocorticoides) o con anticuerpos monoclonales (como el rituximab) dan resultados positivos a largo plazo. La extirpación quirúrgica del timo también es considerada una opción terapéutica con resultados beneficiosos a largo plazo. Aunque el tratamiento es de por vida, la mayoría de paciente obtienen buenos resultados mejorando su sintomatología y por ende su calidad de vida (Drachman DB, 2016; Lee & Jander, 2016).

#### **d) Relajantes musculares directos**

Fármacos como el **dantroleno** que disminuyen la liberación de calcio del RS mediante el bloqueo de los receptores RyR1 producen desacoplamiento excito-contráctil y por lo tanto menor contractilidad.

El dantroleno es el fármaco de elección en la profilaxis y tratamiento de la hipertermia maligna.

La hipertermia maligna es un desorden farmacogénético disparado por el uso de algunos anestésicos generales halogenados y /o succinilcolina y es caracterizado por síntomas como aumento de la temperatura corporal, rigidez del músculo esquelético y acidosis metabólica. Este desorden está asociado a la mutación del receptor de rianodina 1 (RyR1) lo que conduce a un manejo del calcio desequilibrado. La administración temprana de dantroleno ante los primeros síntomas y las suspensión de los agentes que desencadenan dicho desorden son fundamentales en el tratamiento del paciente (Broman y col., 2015)

El dantroleno también se utiliza en otros estados hipercatabólicos y en espasticidad muscular de distintos orígenes como esclerosis múltiple, parálisis cerebral, lesión medular o golpe de calor.

## **Preparados biológicos para el estudio experimental de fármaco que actúen en el músculo esquelético**

La unión neuromuscular es una de las sinapsis más extensamente estudiadas dado que ha servido como prototipo para el estudio y la comprensión de la transmisión eléctrica y la comunicación entre neuronas y células efectoras dentro de los sistemas centrales y periféricos nerviosos.

En el siguiente apartado se describirán dos preparados biológicos de respuesta contráctil diferente utilizados en laboratorio para el estudio de la unión neuromuscular y el músculo esquelético.

### **Recto abdominal de batracio**

Si bien el recto abdominal de batracio es un músculo estriado, este no se comporta como un músculo voluntario y responde al agregado de Ach o a drogas agonistas nicotínicos musculares dando una contracción lenta y sostenida comúnmente denominada contractura (Figura 12) Por

lo tanto, el aislamiento de este músculo forma parte de una a preparación experimental extremadamente útil. Con este preparado podemos mostrar en el laboratorio las acciones compuestas que bloquean la transmisión en la unión neuromuscular y también de compuestos que actúan aumentando la concentración de Ach en dicha unión.

Este preparado puede ser realizado a partir de cualquier batracio de aproximadamente 150 gramos de peso. Una vez anestesiado se posiciona el animal en forma decúbito dorsal y se disecciona la piel externa sin cortar el abdomen. Luego se corta a través del esternón justo por encima de la base, se carga por el margen del músculo recto abdominal (Figura 12), se levanta suavemente y se corta. Una vez aislado el músculo se transfiere a una caja de petri con solución Ringer batracio.

Dado que los batracios son animales de sangre fría, el músculo una vez que fue aislado es mantenido a temperatura ambiente durante todo el experimento. El mismo se divide en dos y se ata de ambos extremos. Uno de los ellos es fijado a una cuba de doble camisa (Figura 13) mientras que el otro a un extremo móvil o palanca que se encuentra acoplado a un traductor de fuerza. La precarga sobre la palanca se ajusta entre 0.5 y 1 gramo con una pesa para asegurarse que el músculo vuelva a su línea de base luego del agregado de cada droga (Kitchen, 1984).

La precarga de la preparación debe establecerse unos 30 minutos previos a que el experimento comience.

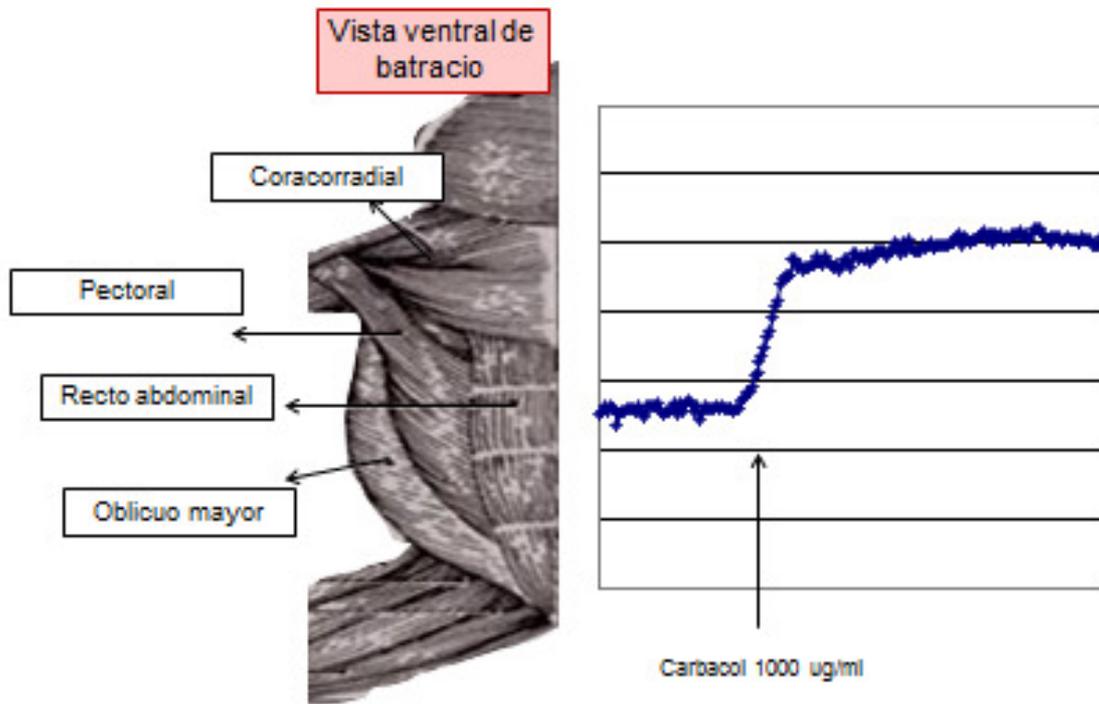


Figura 12: Vista ventral de los músculos esqueléticos abdominales de batracio (izquierda) y registro típico de fuerza de contracción de recto abdominal de batracio (derecha)



Figura 13: Foto de una cuba de doble camisa donde se monta el preparado

### Algunos protocolos a realizar en el laboratorio y cuestiones para pensar

1. ¿Qué respuesta obtendría al tratar el recto abdominal de batracio con Ach?  
¿Cómo ejerce su efecto Ach en este músculo? ¿De dónde proviene el  $\text{Ca}^{2+}$  para la contracción en el músculo esquelético?
2. ¿Qué efectos produce en el músculo esquelético el agregado de succinilcolina a bajas dosis? ¿Y cuáles a dosis mayores?
3. Grafique los registros que obtendría con el agregado de fisostigmina previo al agregado de Ach. Justifique.
4. Grafique en secuencias los registros a obtener con las siguientes intervenciones experimentales y explique los respectivos mecanismos de acción en un preparado de recto abdominal de batracio
  - control – Ach- lavado- neostigmina y sin lavar Ach (igual dosis)
  - control - adrenalina – lavado – Ach – lavado – pancuronio y sin lavar Ach (igual dosis)
  - control – Ach – lavado – Succinilcolina y sin lavar Ach.

### Preparación de nervio frénico-diafragma de rata

En contraste con el recto abdominal de batracio, la respuesta a la estimulación del nervio es una contracción rápida como consecuencia de la liberación acetilcolina en la región especializada de la placa motora terminal. Esta liberación causa una despolarización local produciendo un potencial de placa terminal. Por lo tanto, este preparado nos permitirá observar las características espigas o twitch del músculo esquelético (Figura 14). Las respuestas contráctiles de estas fibras son todo o nada a diferencia de las contracciones graduales observadas en el recto abdominal o en preparaciones de músculo liso (Kitchen, 1984; Levingstone, 1970).

Esta preparación es útil para el estudio de los efectos de diferentes drogas sobre las espigas contráctiles del diafragma en respuesta a un estímulo eléctrico sobre el nervio frénico. Una vez que la rata (200 gramos aproximadamente) fue anestesiada con uretano se corta el tórax en forma vertical a través del esternón y se abre hacia la parte superior. Dado que el nervio frénico se extiende desde el diafragma hacia el timo (Figura 14), para su remoción se corta debajo del diafragma separando las costillas, continuando la incisión por el borde de las mismas hacia la vena cava. Una vez allí, se libera el nervio frénico y se corta tan cerca del timo como sea posible. La preparación así aislada se transfiere hacia una caja de petri que contenga solución Krebs. Se sujetan dos hilos al preparado: uno al ápice del diafragma y el otro hacia final de nervio. Una vez sujetado de esta forma se monta en una cuba de doble camisa que contiene solución de Krebs burbujeada con carbógeno y termostaticada a 37°C. Se aplica un estímulo de campo mediante un estimulador eléctrico a frecuencia constante y se registra.

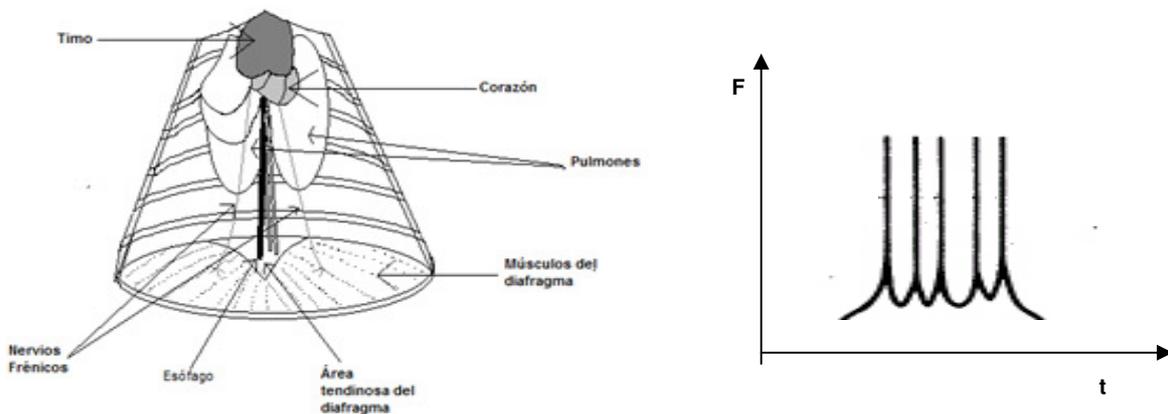


Figura 14: Esquema del tórax de la rata donde se puede observar el músculo del diafragma y los nervios frénicos (izquierda) y registro típico de fuerza de contracción del preparado diafragma-nervio frénico de rata (derecha)

### Algunos protocolos a realizar en el laboratorio y cuestiones para pensar

1. ¿Qué respuesta obtendría al tratar el preparado de diafragma de rata con estímulo eléctrico con Ach? ¿Y con fisostigmina?
2. ¿Qué efectos produce en este preparado el agregado de neostigmina? Y el agregado de pancuronio? Justifique su respuesta.
3. Grafique en secuencias los registros a obtener con las siguientes intervenciones experimentales y explique los respectivos mecanismos de acción en un preparado de nervio frénico-diafragma de rata con estímulo eléctrico
  - i) control – carbacol - lavado- piridostigmina – lavado – piridostigmina 2 min y sin lavar carbacol (igual dosis)
  - ii) control – Ach – lavado – piridostigmina 2 min y sin lavar Ach (igual dosis) (compare con la respuesta obtenida en i))
  - iii) control – Ach – lavado – Succinilcolina (baja dosis)

## Bibliografía

- Barone, V., Randazzo, D., Del Re, V., Sorrentino, V., Rossi, D. (2015). Organization of junctional sarcoplasmic reticulum proteins in skeletal muscle fibers. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 36(6), 501-515.
- Bevan, D.R. (1994). Succinylcholine. *Canadian Journal of Anaesthesia*. 41(6), 465-8.
- Broman, M, Islander, G, Müller, CR. (2015). Malignant hyperthermia, a Scandinavian update. *Acta Anaesthesiologia Scandinavia*. 59(8), 951-61.
- Cohen-Cory, S. (2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science*. 298(5594), 770-6.
- Drachman, D.B. (2016). Myasthenia gravis. *Seminars in Neurology*. 36, 419-424.
- Farhat, K., Waheed, A., Pasha, A.K., Tariq, M. (2013). Effects of rocuronium pretreatment on muscle enzyme levels following succinylcholine. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 26(5), 93942.
- Fernández, D., Mancipe, L., Fernández, D. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista* 18 (1), 84-92.
- Kitchen, I. (1984). Textbook of in vitro Practical Pharmacology. Blackwell Scientific Publications.
- Goodman & Gilman (2014). Las bases farmacológicas de la terapéutica. XII Edición. Interamericana.
- Habre, W., Adamicza, A., Lele, E., Novák, T., Sly, P.D., Petak, F. (2008). The involvement of histaminic and muscarinic receptors in the bronchoconstriction induced by myorelaxant administration in sensitized rabbits. *Anesthesia & Analgesia*. 107(6), 1899-906.
- Lamb, G.D. (2000). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clinic Experimental Pharmacology and Physiology*. 27: 216-24.
- Lang, T., Jahn, R. (2008). Core proteins of the secretory machinery. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 184, 107-27.
- Lee, J.L., Jander, S. (2016). Myasthenia gravis: recent advances in immunopathology and therapy. *Expert Review of Neurotherapeutics*. En prensa.
- Levingstone, E. & S. (1970). Ltd. Department of Pharmacology University of Edinburgh. Pharmacological experiments on isolated preparations. Second Edition.
- Lowe, NJ. (2007). Overview of botulinum neurotoxins. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 9 (Suppl. 1), 11-6.
- Meissner, G., Lu, X. (1995). Dihydropyridine receptor-ryanodine receptor interactions in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Bioscience reports*. Vol 15 No5. 1995.
- Morrison, B.M. (2016). Neuromuscular diseases. *Seminars of Neurology*. 36: 409-418.
- Neumann, J.T., Diaz-Sylvester, P.L., Fleischer, S., Copello, J.A. (2011). CGP-37157 inhibits the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and activates ryanodine receptor channels in striated muscle. *Molecular Pharmacology*. 79(1): 141-7.
- Sanes, JR, Lichtman, JW. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature Reviews Neuroscience*. 2, 791-805.

- Schurch, B. (2004). The role of botulinum toxin in neurourology. *Drugs Today (Barc)*. 40: 205-12.
- Storm, J.E., Rozman, K.K., Doull, J. (2000). Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Toxicology*. 150 (1-3):1-29.
- Turton, K., Chaddock, J.A., Acharya, K.R. (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends in Biochemical Sciences*. 27: 552-8.
- Yu, F.H., Catterall, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*. 4: 207. 2003.
- Watkins, J. (1994). Adverse reaction to neuromuscular blockers: Frequency, investigation, and epidemiology. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. Suppl. 102:6-10.

## CAPITULO 2

### Farmacodinamia cardíaca

*Alicia E. Consolini, R. Gisel Díaz y María Inés Ragone*

*"He aquí mi secreto, que no puede ser más simple:  
sólo con el corazón se puede ver bien, lo esencial es invisible a los ojos"*

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY, El principito

### Potenciales de acción cardíacos y sitios de acción de fármacos

El corazón presenta dos tipos de células excitables especializadas para distinta función: las células marcapasos o automáticas para generación y conducción del potencial de acción (PA), y las células miocárdicas encargadas de la contracción. Ambas presentan diferentes potenciales de acción. Recordemos que las fibras contráctiles de ventrículo o aurícula presentan un potencial de acción rápido (fase 0), seguido por una meseta (fase 2). La duración y amplitud del PA es variable en las distintas partes del corazón, siendo más breve en las fibras auriculares que en las ventriculares. También este potencial rápido es característico de las fibras de Purkinje (sistema de conducción) aunque en estas existe una despolarización diastólica lenta en la fase 4. Esto les da las características de células automáticas, aunque se disparan a menor frecuencia que las de los nódulos sinusal y aurículo-ventricular.

#### a) Fármacos que afectan al potencial de acción del miocardio contráctil

El PA se inicia con la **fase cero**, cuando por la llegada de un estímulo despolarizante (conducido por corrientes de  $K^+$  entre las fibras miocárdicas a modo de sincicio) se alcanza el umbral de activación de los canales de  $Na^+$ . Estos canales voltaje-dependientes generan un gran cambio en el potencial de membrana ( $E_m$ ) desde alrededor de  $-80$  mV hasta  $+20$  o  $+30$  mV, voltaje en el cual se inactivan en aproximadamente 1 ms. El breve período en el cual se produce el flujo del ión se denomina "estado activado". Luego el canal cambia su conformación con la despolarización y alcanza su "estado inactivado". Recién cuando la fibra se repolariza y el  $E_m$  vuelve al potencial inicial ( $-80$  mV o más negativo) el canal vuelve al "estado de reposo".

Mientras el canal de  $\text{Na}^+$  se encuentre inactivado no podrá generarse un nuevo potencial de acción, y entonces la célula se encuentra en su **período refractario**.

La corriente de  $\text{Na}^+$  rápida hacia el interior ( $I_{\text{Na}}$ ) puede ser bloqueada selectivamente por tetrodotoxina (TTX), que se une irreversiblemente al canal impidiendo la activación del mismo, y esta herramienta se emplea farmacológicamente para detectar la corriente o bloquearla. Pero terapéuticamente existen fármacos capaces de bloquear la  $I_{\text{Na}}$  que, consecuentemente, disminuyen la velocidad máxima de despolarización ( $V_{\text{máx}}$ ) de la fase 0. Los **bloqueantes de los canales de  $\text{Na}^+$**  incluyen a **quinidina, procainamida, disopiramida, lidocaína, fenitoína, mexiletina** y a los actualmente más empleados en terapéutica **flecainida y propafenona**. Son fármacos con propiedades **antiarrítmicas** que por este mecanismo se clasificaron como **de clase I** (según la clasificación de Vaughan-Williams). También la **amiodarona** es un antiarrítmico bloqueante de la corriente de  $\text{Na}^+$ , aunque ha sido clasificado de **clase III** por su prolongación del PA (Figura 1).

Los bloqueantes de los canales de  $\text{Na}^+$  se enlazan al canal de  $\text{Na}^+$  preferentemente en el estado inactivado (o incluso en el breve período activado). Por ello, el efecto es dependiente de la frecuencia de estimulación (a mayor frecuencia habrá más posibilidades de encontrar canales en el estado inactivado) y del voltaje (la despolarización inactiva los canales). De este modo, se obtiene mayor bloqueo cuando el corazón late con más frecuencia (en taquicardia son más efectivos) o si está parcialmente despolarizado (por ej. durante la isquemia miocárdica que promueve arritmias). Estas características le dan selectividad a los fármacos antiarrítmicos, de modo que bloqueen los PA anormales sin afectar el ritmo y conducción normal cardíaco.

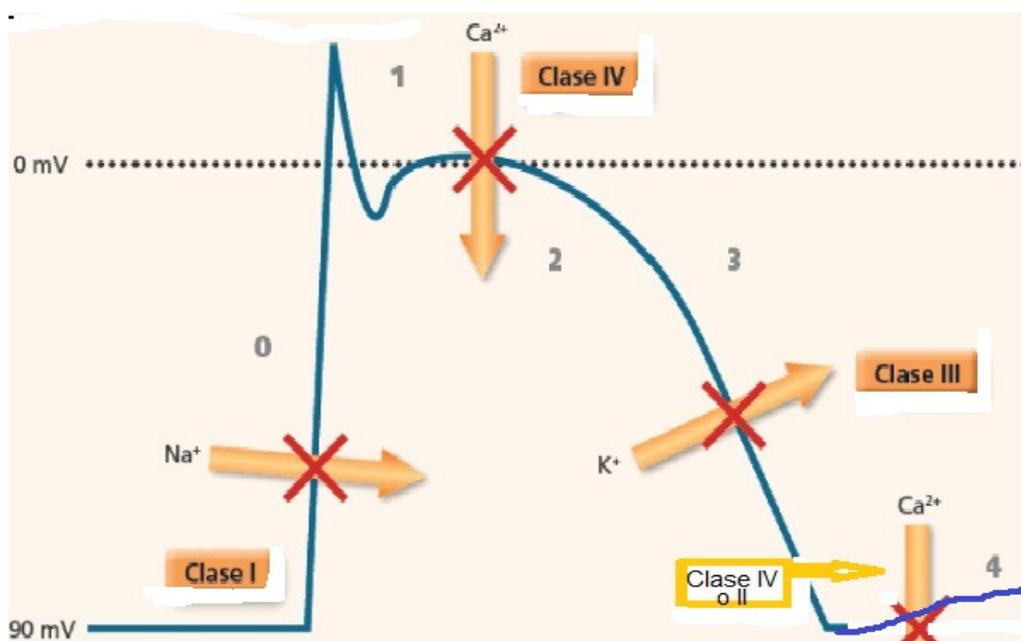


Figura 1: Esquema de un potencial de acción miocárdico ventricular en el que se marcan los canales que son el blanco de inhibición de las drogas antiarrítmicas según la clasificación de Vaughan-Williams. La fase 4 tiene despolarización espontánea en las fibras de Purkinje. Leer los mecanismos correspondientes en el texto.

Luego de la fase 0 se observa una repolarización rápida pero poco duradera, conocida como **fase 1**, que se debe al eflujo de  $K^+$  (antes se consideraba debida al ingreso de  $Cl^-$ ). La porción del PA que se desarrolla a voltajes positivos se denomina "overshoot". No se conocen fármacos que actúen en esta fase.

La **fase 2** o de meseta se origina por una corriente lenta despolarizante transportada principalmente por  $Ca^{2+}$ , que ingresa a través de canales tipo L. Estos canales lentos (L) se activan a alrededor de -40 mV y se inactivan en aproximadamente 50 mseg (notar diferencia con la  $I_{Na}$ ). Le dan a la meseta una duración de 180 a 200 mseg. Los canales lentos son insensibles a TTX pero pueden ser **bloqueados por magnesio, manganeso y cadmio**, que compiten con el  $Ca^{2+}$  por ser cationes divalentes, y por fármacos conocidos como **antagonistas cálcicos o bloqueantes de calcio (BCa), por ej. verapamil y diltiazem (antiarrítmicos clase IV)**, que se enlazan al canal lento cuando está inactivado demorando su próxima reactivación. Bloquean el influjo de  $Ca^{2+}$  de modo dependiente de la frecuencia y del voltaje. Es decir, que el bloqueo es mayor cuando existe taquicardia o arritmias, lo cual le da selectividad a estos fármacos para corregir la anomalía en el ritmo de células arritmogénicas sin afectar a las fibras normales.

Además de regular la duración del PA, la corriente de  $Ca^{2+}$ -tipo L ( $I_{Ca,L}$ ) es el principal regulador del proceso de excitación-contracción, promoviendo la liberación de  $Ca^{2+}$ -inducida por  $Ca^{2+}$ . Es estimulada por las **catecolaminas** que actúan en el receptor  **$\beta$ -adrenérgico**. In vivo los antagonistas del receptor  $\beta$ -adrenérgico (algunos de los cuales son considerados antiarrítmicos de clase II) reducen indirectamente a las corrientes de  $Ca^{2+}$ . El receptor  $\beta$  se acopla mediante una Gs a la cascada de activación de la adenilatociclasa (AC) y se estimula una proteína-quinasa A (PKA) que fosforila los canales L, aumentando así la amplitud de la corriente de  $Ca^{2+}$  (como se verá más adelante). Al canal de tipo L se lo denomina también receptor de dihidropiridinas (DHPR, dihydropyridine receptor) dada su sensibilidad característica a este grupo de compuestos que pueden actuar como bloqueantes (**nifedipina, amlodipina, nitrendipina, nisoldipina y otros derivados**). En realidad, a dosis terapéuticas las DHP actúan en el músculo liso vascular pero su afinidad no les permite bloquear a los canales L del corazón a las concentraciones plasmáticas alcanzadas.

A pesar de que existe otro tipo de canales de  $Ca^{2+}$  en el músculo cardíaco, denominados **canales T** (o transitorios de rápida inactivación), éstos están presentes predominantemente en el sistema de conducción, y no participan significativamente en la contracción miocárdica. Ambos se activan por despolarización de la membrana y se inactivan de modo tiempo y voltaje-dependiente. La corriente T se inactiva más rápidamente que la L, y completamente a potenciales más positivos que -30 mV o a potenciales mantenidos estables de -50 mV, mientras la L permanece activa (Bers, 2001).

En el Em correspondiente a la meseta (fase 2) se activan las corrientes repolarizantes de  $K^+$  (hacia el exterior), provenientes de un grupo heterogéneo de canales. El mayoritario es el **"canal rectificador tardío"** cuya corriente ( $I_K$ ) tiene dos componentes (uno de activación rápida y otro que se activa lentamente durante la meseta) y es la iniciadora de la **fase 3 de repolarización**. El componente rápido puede ser bloqueado por los antiarrítmicos **sotalol y**

**amiodarona** que prolongan el PA (por lo cual son considerados de clase III) y por **quinidina** y **procainamida** (considerados de clase Ia). A consecuencia de ese bloqueo de la  $I_K$  estos fármacos antiarrítmicos pueden producir un alargamiento del intervalo QT del ECG que conduce a efectos arritmogénicos (arritmia tipo "**torsade de points**"). Esto ha provocado un uso limitado de estos fármacos antiarrítmicos en terapéutica, especialmente de los de clase Ia. La  $I_K$  es dependiente del voltaje, se activa con la despolarización durante la fase 2 y se inactiva a potenciales mayores de -50 mV (más negativos). Es estimulada por fosforilación mediada por las proteínas-quinasas PKC y PKA. Durante la estimulación  **$\beta$ -adrenérgica** se aumenta la amplitud de la  $I_K$  por la vía de PKA, y esto evita la excesiva prolongación del PA debida a la simultánea estimulación de la  $I_{Ca,L}$  por la PKA.

Por otra parte, en el corazón existe la **corriente de  $K^+$  "rectificadora anómala"** ( $I_{K1}$ ) que promueve el eflujo de  $K^+$  a  $E_m$  entre -55 y -90 mV, y así contribuye a la repolarización (**fase 3**). Debido a que su conductancia varía con el voltaje, esta corriente contribuye a la despolarización durante la meseta previniendo la pérdida de  $K^+$  durante la fase 2. Al igual que la  $I_K$ , la  $I_{K1}$  puede ser bloqueada por **sotalol**. Esta corriente  $I_{K1}$  debe su nombre a que a  $E_m$  más negativos que -100 mV "rectifica" ingresando  $K^+$  a la célula, pero esto es inalcanzable en condiciones fisiológicas ("anómalo").

En síntesis, **la  $I_K$  controla el inicio de la fase 3 de repolarización, mientras la  $I_{K1}$  controla la última porción de la fase 3**. Ambas corrientes son sensibles a los cambios en la  $[K^+]_e$  contribuyendo por ejemplo a generar arritmias cuando la  $[K^+]_e$  es inferior a la fisiológica (2 a 5 mM).

Existe otra corriente rectificadora de  $K^+$ , la  **$I_{KATP}$  dependiente de ATP**, la cual se activa cuando la relación de concentraciones de ATP/ADP cae, por ejemplo en la hipoxia o en la isquemia. Cumple la función de acelerar la repolarización o fase 3, con lo que acorta la fase 2 de meseta. Así protege al miocardio hipóxico, reduciendo el influjo de  $Ca^{2+}$  y el consumo de energía en la contracción. Esta corriente es la responsable de que la contractilidad caiga abruptamente durante los primeros 3 minutos de isquemia o hipoxia cardíaca. Además, la  $I_{KATP}$  puede activarse por los fármacos llamados **abridores de K (diazóxido, cromakalim, nicorandil)** y bloqueada por las **sulfonilureas (por ej. glibenclamida, glipizida, y otras)**. Estas últimas tienen propiedades hipoglucemiantes porque los mismos canales  $K_{ATP}$  están presentes en las células beta pancreáticas y median el mecanismo de liberación de insulina.

## **b) Fármacos que actúan sobre el potencial de acción marcapaso**

Recordemos que las células automáticas componen el sistema de conducción en las siguientes estructuras: nódulo sinoauricular (SA), nódulo aurículo-ventricular (AV), fibras de Purkinje y haz de His. Todas ellas tienen la propiedad de automatismo, pero las que exhiben mayor frecuencia de disparo son las del nódulo SA, por lo cual este asume la conducción del marcapaso cardíaco. El PA de los nódulos SA y AV tiene las siguientes características esquematizadas en la Figura 2.

El potencial diastólico máximo de las células SA es de aproximadamente - 50 a - 60 mV, por lo cual los canales rápidos de  $\text{Na}^+$  están totalmente inactivados, aún si estuvieran presentes. Entonces, la fase de despolarización (fase 0) se debe a los **canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L**, por lo que las células marcapaso SA y AV tienen PA lentos. Además, hay escasa expresión de los canales de  $\text{I}_{\text{K1}}$ . Durante la **fase 4** se produce la llamada “**despolarización diastólica lenta**” y espontánea, provocada por la inhibición de la conductancia al  $\text{K}^+$  por desactivación gradual de la corriente rectificadora tardía ( $\text{I}_{\text{K1}}$ ) predominante en la fase 3, que tiene una constante de tiempo de 300 ms. Además, durante la fase 4 se activan la **corriente marcapaso  $\text{I}_f$**  (“funny” de  $t_{1/2}$  1-2 s) permeable a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , que favorece la despolarización, y la **corriente del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$**  (que permite el eflujo de 1  $\text{Ca}^{2+}$  y el ingreso de 3  $\text{Na}^+$ , conduciendo carga positiva al interior celular). Recientemente se desarrolló un fármaco capaz de bloquear a la corriente  $\text{I}_f$  que se denominó **ivabradina**, inhibe a los canales activados por lo cual actúa en modo dependiente de la frecuencia cardíaca, al igual que otros antiarrítmicos, y reduce la taquicardia sinusal sin afectar la contractilidad, siendo útil en el angor y en la insuficiencia cardíaca congestiva.

En la fase 4 también se activan corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como la  $\text{I}_{\text{Ca,T}}$  (transitoria y de rápida inactivación) y la  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  (de lenta duración) a -50 mV y -30 mV, respectivamente. Debido a que en el último tercio de la fase 4 comienzan a activarse los canales L, la frecuencia cardíaca puede ser disminuida por bloqueantes (BCa) como **verapamilo y diltiazem**, que producirán bradicardia. También pueden disminuirla los **abridores de canales de  $\text{K}^+$** .

Cuando la célula alcanza espontáneamente el **potencial umbral** (entre - 40 y -30 mV) se activa la mayor proporción de canales L, y aumenta bruscamente la pendiente del PA en lo que se denomina **fase 0 de despolarización**. Esta lleva el Em hasta los + 10 o +15 mV, voltaje en el cual se inactivan totalmente los canales L. Además a ese voltaje se activa la corriente rectificadora de  $\text{K}$  ( $\text{I}_{\text{K}}$ ) (en el rango de -50 a +20 mV) comenzando la fase 3 de repolarización.

**Adrenalina y acetilcolina** regulan en forma importante y opuesta al PA marcapaso. La **corriente  $\text{I}_f$**  es sensible a adrenalina (ya que se activa por unión directa de AMPc) y a acetilcolina (puesto que la  $\text{G}_i$  inhibe a la  $\text{I}_f$ ). La **corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L** es estimulada por la vía adrenérgica mediante fosforilación por PKA. La **corriente  $\text{I}_{\text{K}}$**  es sensible a acetilcolina ( $\text{I}_{\text{K,Ach}}$ ) porque se activa por el acoplamiento del receptor muscarínico M2 con la subunidad  $\text{G}_i\beta\gamma$  de la proteína  $\text{G}_i$ .

La frecuencia cardíaca está determinada por la frecuencia de disparo de las células del nódulo S.A., que depende de cambios en la pendiente de la fase 4 y de las magnitudes de los potenciales diastólicos máximo (PDM) y umbral (PU). El organismo controla dicha frecuencia marcapaso por estimulación adrenérgica y colinérgica (nervio vago). La **adrenalina aumenta la pendiente de la fase 4** (mayor velocidad de despolarización diastólica espontánea) **y la velocidad de conducción SA y AV**. El mecanismo es el incremento de las corrientes despolarizantes **L** e  **$\text{I}_f$**  y de la corriente repolarizante  $\text{I}_{\text{K}}$ , con lo que se aumenta el PDM y se acorta el tiempo para alcanzar el PU. El mecanismo se inicia con la unión de la catecolamina al **receptor  $\beta$**  lo cual en el borde intracelular activa a una proteína Gs. La Gs estimula a la adenilatociclasa (AC) que cataliza la producción de AMPc. El AMPc estimula directamente a la  **$\text{I}_f$**  y activa a la PKA, la cual fosforila al canal de  $\text{Ca}$  tipo L. Recordemos que la activación del canal L es disparada por

la despolarización de fase 0, pero la fosforilación de la PKA aumenta el influjo de Ca, originando taquicardia e inotropismo positivo. Además, adrenalina acorta la duración del PA, por aumento de las corrientes repolarizantes  $I_K$  y  $I_{K1}$ . Por esto se preserva la diástole, dado que se alcanza un potencial diastólico máximo (PDM) más negativo. El resultado total del mayor PDM y aumentada  $I_{Ca,L}$  es un **aumento en la pendiente de la fase 4 de despolarización diastólica lenta**, y una mayor frecuencia de las células marcapaso (**taquicardia**).

La **acetilcolina (ACh)** liberada desde el nervio vago disminuye la frecuencia de las células marcapaso del nódulo SA y AV, y reduce la velocidad de conducción del sistema de conducción, pudiendo llegar al paro cardíaco. Actúa en sus **receptores muscarínicos M2** acoplados a una proteína  $G_i$ . La ACh disocia a la proteína  $G_i$  liberando las subunidades  $G_\alpha$  que inhibe a la adenilatociclasa (AC) y  $G\beta\gamma$  que **activa directamente a canales de  $K^+$  de tipo  $K_{ACh}$** . Estos canales permiten el eflujo de  $K^+$  que **hiperpolariza** a los nódulos SA y AV, lentifica la conducción AV y acorta el PA auricular (que es mucho más corto que el ventricular). Esta corriente disminuye la velocidad de la despolarización diastólica lenta (**reduce la pendiente de la fase 4**). La ACh puede causar también un desplazamiento de la función marcapaso dominante desde las células más rápidas, ubicadas en el centro del nodo sinusal, hacia otras células periféricas de menor frecuencia. Además, la estimulación del receptor  $M_2$  por  $K_{ACh}$  ejerce efectos **indirectos** vía proteína  $G_{ai}$ : inhibe a la adenilatociclasa (AC) por lo que disminuyen los niveles de AMPc (oponiéndose a la estimulación simpática y reduciendo la  $I_{Ca,L}$ ) **y estimula a la óxido nítrico sintasa (NOS)**. Aumenta la producción de GMPc, el cual activa a una fosfodiesterasa (PDE) que reduce aún más el nivel de AMPc. Los bajos niveles de AMPc resultantes **reducen las corrientes  $I_{Ca,L}$  e  $I_f$**  contribuyendo a la reducción de la frecuencia cardíaca y de la velocidad de conducción (**bradicardia**) (Schulz y Triggle, 1994).

En las células contráctiles ventriculares hay escaso número de receptores M2 para ACh, por lo que la ACh no ejerce efectos importantes sobre el PA ventricular.

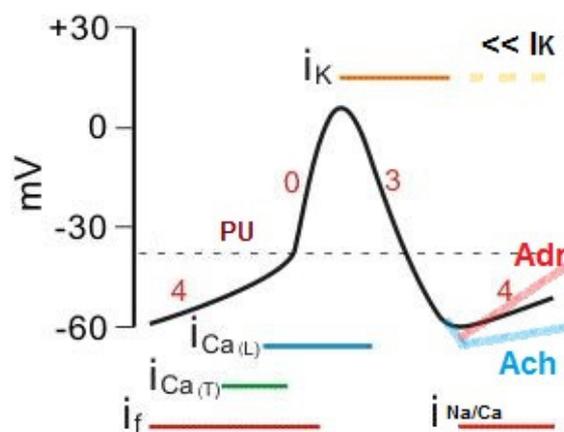


Figura 2: Esquema de un potencial de acción marcapaso (de nódulos SA y AV) en el que se marcan los períodos en que se activan o desactivan (<<) las corrientes responsables de la despolarización diastólica lenta (fase 4). Se indican también los cambios en la pendiente de la fase 4, producidos por los neurotransmisores autonómicos acetilcolina (ACh) y adrenalina (Adr). Leer los mecanismos correspondientes en el texto.

### c) Efectos de fármacos sobre los parámetros electrofisiológicos cardíacos

Los parámetros que permiten evaluar alteraciones fisiopatológicas y efectos de fármacos, son los siguientes:

\* **Amplitud del PA:** diferencia de voltaje total que ocurre durante la fase cero. Generalmente no es afectada significativamente por fármacos.

\* **Velocidad de despolarización máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ):** depende de la pendiente de la fase cero. El valor de la  $V_{m\acute{a}x}$  permite clasificar a los tejidos miocárdicos en:

- **tejidos de respuesta rápida,** cuya fase cero depende de la  $I_{Na}$ , y dura menos de 5 ms. Es típico de las fibras contráctiles miocárdicas y las fibras de Purkinje. La  $V_{m\acute{a}x}$  de estos tejidos se reduce con los *bloqueantes de canales de  $Na^+$  (BNa)*

- **tejidos de respuesta lenta,** cuya fase cero depende de la  $I_{Ca}$ , y dura alrededor de 50-100 ms. Es típico de las células de los nódulos SA y AV. La  $V_{m\acute{a}x}$  se reduce con los *bloqueantes de canales de  $Ca^{2+}$  cardioselectivos (BCa CS)*.

\* **Duración del PA (DPA):** el periodo de tiempo transcurrido desde el comienzo de la fase 0 hasta el final de la fase 3. En tejidos de respuesta rápida, el aumento de la frecuencia de estimulación por **catecolaminas** abrevia la duración y la refractariedad en ciertos límites.

\* **Frecuencia cardíaca (automaticidad):** depende de la frecuencia del nódulo SA y está determinada por la pendiente de la fase 4 de células marcapaso. Es reducida por los fármacos *bloqueantes beta-adrenérgicos (BB)* y por los *BCa CS*.

\* **Período refractario absoluto (PRA):** período durante el cual la célula no puede responder a otro estímulo, aunque sea de máxima intensidad. Abarca desde el comienzo de la despolarización hasta alrededor del 50 % de la repolarización.

\* **Período refractario relativo (PRR):** es el mínimo período durante el cual puede obtenerse una respuesta al segundo estímulo, pero el estímulo debe ser supranormal y el segundo PA tendrá una  $V_{m\acute{a}x}$  inferior a la normal. El PRR abarca generalmente hasta el final de la repolarización.

\* **Período refractario efectivo (PRE):** es el mínimo período durante el cual puede obtenerse un segundo PA, pero éste es débil y no propagado. Es una respuesta local, no propagada, con bajas velocidades  $V_{m\acute{a}x}$  y de conducción. Se generan así los PA característicos de la arritmogénesis, en los que aparecen post-despolarizaciones tempranas o tardías, que tienen menor velocidad de conducción en los tejidos de respuesta rápida. En cambio, en los tejidos de respuesta lenta como son los nódulos SA y AV el periodo refractario se extiende durante toda la diástole evitando posibles extrasístoles. Las *drogas antiarrítmicas con propiedades BNa* siempre aumentan el PRE en relación a la duración (DPA) del potencial de acción (aumentan el cociente PRE/DPA). Eso se debe a que tienen afinidad por el estado inactivado del canal de  $Na^+$ , elevando el potencial ( $\Delta E_m$ ) necesario para que los canales vuelvan al estado de reposo. Consecuentemente, el PR se extiende hasta el  $E_m$  correspondiente al reposo diastólico, es decir se prolonga desde alrededor del 50% al 95-100% de la fase 3 (*para ampliar ver capítulo de Drogas Antiarrítmicas en Goodman y Gilman, 2014*).

\* **Velocidad de conducción:** velocidad a la cual se propaga el estímulo o PA entre dos regiones del corazón. Depende de la velocidad de la fase cero. Cuando una fibra de respuesta rápida se despolariza por activación de la  $I_{Na}$  la variación de potencial de membrana local resulta menos negativo que en las porciones vecinas de la célula, produciéndose una fuerza conductora para la corriente longitudinal en el mioplasma a través de uniones "gap" entre células. Esta corriente longitudinal es principalmente transportada por  $K^+$  y desplaza cargas negativas del interior de la membrana despolarizando las zonas adyacentes hasta alcanzar el potencial umbral para la apertura de canales de  $Na^+$ . Normalmente los impulsos generados en el nódulo SA excitan secuencialmente a la aurícula, el nódulo AV, el haz de His, las fibras terminales de Purkinje y el tejido ventricular.

Las fibras miocárdicas contráctiles y de His-Purkinje tienen alta o rápida velocidad de conducción, la cual es *sensible a los BNa*. Las células de los nódulos SA y AV tienen lenta velocidad de conducción, la cual es *sensible a los BB y BCa*.

## Contractilidad miocárdica y efectos de fármacos

El corazón tiene dos mecanismos básicos para regular su contracción "todo o nada", que son: la variación de la fuerza contráctil dependiendo de la sensibilidad de miofilamentos al  $Ca^{2+}$  (determinada fisiológicamente por la longitud inicial de la fibra, según lo expresa la ley de Frank Starling, o aumentada por la vía adrenérgica), y la variación de la cantidad de  $Ca^{2+}$  que alcanza los miofilamentos (sensible a fármacos que aumentan o disminuyen su concentración citosólica).

Recordemos cuál es el mecanismo básico de la contracción miocárdica para identificar sitios y mecanismos de acción de fármacos que la alteran:

Es bien sabido que el miocardio depende del  $Ca^{2+}$  extracelular para poder contraerse. Ahora bien, en el miocardio se desarrolla un sistema de amplificación de la señal de  $Ca^{2+}$  extracelular: la **liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$**  (ver una revisión extensa en Langer 1997). La Figura 4 muestra los sistemas participantes en la homeostasis de calcio y en el gasto energético que permite realizar transportes activos, acoplamiento actomiosínico y recuperación metabólica del ATP y fosfocreatina (PCr). Analicemos en orden secuencial la participación de cada una de las fuentes y destinos del  $Ca^{2+}$  durante el ciclo de contracción-relajación miocárdico, pero tengamos en cuenta que algunas de ellas ocurren simultáneamente porque dependen de transportadores con afinidad similar por el  $Ca^{2+}$ .

1- Cuando el miocardio está en **reposo** (diástole) todos los compartimentos intracelulares están en equilibrio con una concentración de  $Ca^{2+}$  citosólica ( $[Ca^{2+}]_i$ ) de 0.1  $\mu$ M, mientras la lámina externa del sarcolema (SL) está en equilibrio con una  $[Ca^{2+}]_o$  (extracelular) de 1-2 mM (en plasma es 1.8 mM). Sin embargo, no ocurren apreciables movimientos netos de  $Ca^{2+}$  debido a la baja permeabilidad de la membrana plasmática al  $Ca^{2+}$ . El  $Ca^{2+}$  extracelular se enlaza al SL en su lámina externa formada por moléculas cargadas negativamente como son los fosfolípidos y recubiertas por

la porción oligosacárida de glicoproteínas, especialmente el ácido siálico que constituyen la capa externa conocida como **glicocálix**. Esta capa superficial controla la permeabilidad celular al  $\text{Ca}^{2+}$  durante el reposo, permitiendo su distribución hacia sitios enlazantes intracelulares de alta afinidad que servirán de reserva para la contracción. El glicocálix también proporciona  $\text{Ca}^{2+}$  para las dos rutas de influjo durante la **activación de la contracción**.

2- Durante la fase 2 del PA el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a la célula a través de los **canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L**. La cantidad que ingresa depende de la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  (en el rango de hasta 2 mM, ya que a esta concentración se saturan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y del grado de fosforilación de los canales por catecolaminas (mediada por PKA dependiente de AMPc). Este influjo es insuficiente para desarrollar por sí mismo la contracción, pero dispara la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (RS). Es discutida la participación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sarcolemal (NCX) en modo de influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el PA, ya que se considera que éste provee un aporte nulo o escaso en condiciones fisiológicas porque el  $E_m$  está mayormente más negativo que el potencial de reversa del NCX ( $E_r = 3 E_{\text{Na}} - 2 E_{\text{Ca}}$ ). Su contribución al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  podría suceder sólo durante la fase 1 de potenciales positivos, y ello es muy breve.

3- El  $\text{Ca}^{2+}$  ingresado por canales L se concentra en una zona de la célula denominada "cleft" ubicada en la díada entre el túbulo T y el retículo sarcoplásmico (RS). Inmediatamente, se genera el proceso de **liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS** inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el "cleft" de la díada. El inductor es el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresado por los canales de Ca tipo L sensibles a dihidropiridinas (**DHP**) y activable durante la fase 2 del PA. El  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado del RS a través de los **canales sensibles a Rianodina de tipo 2 (RyR2)** (denominados así porque la toxina rianodina los bloquea irreversiblemente). **Los canales RyR2 son sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  y también a la fosforilación por PKA (dependiente del efecto de catecolaminas) y por la CaMKII (quinasa dependiente de calmodulina y  $\text{Ca}^{2+}$  subtipo II)** en sitios diferentes. La PKA fosforila los residuos Ser2808 y Ser2030, mientras la CaMKII fosforila residuos Ser2808 y Ser2814, ambas acciones de quinasas estimulan a los canales RyR2. No hay contacto físico entre los receptores de DHP (DHPR) y RyR2, como en el caso del músculo esquelético. El único contacto es a través del pulso de  $\text{Ca}^{2+}$  ingresado por canales L. Cuanto mayor es el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mayor es la cantidad liberada desde el RS y, por lo tanto, mayor es la contracción, hasta alcanzar el límite de saturación de la  $I_{\text{Ca,L}}$  que está entre 1 y 2 mM. Esta amplificación es producida por el reclutamiento de más canales RyR2 en respuesta a un aumento en el número de canales DHPR activados por voltaje. Un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (o DHPR) regula a 4 canales RyR2, que pueden reclutarse parcial o totalmente. En resumen, un pequeño influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales L (o DHPR) se amplifica para dar un mayor flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado al citosol a través de los RyR2 (alta ganancia para activar la contracción). Microscópicamente se han identificado pequeños cuantos de  $\text{Ca}^{2+}$  liberados desde el RyR2 aún en el reposo diastólico, que se denominan "*sparks*" (chispas) en la zona rodeada por los DHPR y los RyR2. Cuando se activa la  $I_{\text{Ca,L}}$  en fase 2, muchos *sparks* se sincronizan para formar ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  ("*waves*") que recorren longitudinalmente al cardiomiocito, y pueden desincronizarse en alguna situación predisponente (Mattiuzzi y col., 2015). El

$\text{Ca}^{2+}$  liberado sincrónicamente se suma temporal y espacialmente para dar un “transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ ” (“*transient*”). Finalmente, la magnitud del transitorio depende de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, y éste a su vez depende de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre en la cisterna del RS, de la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  inductor ingresado por los canales L y de la velocidad a la cual éste llegue al “cleft” y forme “waves”. Como describiremos más adelante, las intervenciones que aumentan la  $I_{\text{Ca,L}}$  (como **adrenalina**) o reducen el eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (como los **cardiotónicos digitálicos**) aumentarán al transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la contractilidad (inotropismo positivo). La fosforilación por CaMKII del residuo Ser2814 parece ser responsable de la pérdida o fuga (“*leak*”) de  $\text{Ca}^{2+}$  diastólica que conduce a arritmogénesis, y el antiarrítmico flecainida parece reducir esta pérdida o fuga.

4- El  $\text{Ca}^{2+}$  difunde en forma de “waves” hacia los **miofilamentos** para enlazarse a la troponina C (TnC) y activar la contracción. Recordemos brevemente que la regulación de la actividad actomiosínica en el miocardio depende de actina, al igual que en el músculo esquelético. Cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  o citosólica se eleva a 10  $\mu\text{M}$ , este se enlaza al sitio afín de la molécula de troponina C (TnC). El complejo troponina (T, I y C) con tropomiosina sufre un cambio conformacional por el que Tn-I libera el sitio activo de la molécula de actina que generaba inhibición pre-existente del acoplamiento actomiosínico. Así, puede formarse el puente actinmiosínico y activarse la ATPasa de la miosina. La hidrólisis del ATP es un proceso exotérmico que genera la energía libre necesaria para producir el deslizamiento de los miofilamentos actomiosínicos, es decir, la contracción. La velocidad de la actividad ATPásica de la miosina puede ser incrementada por la fosforilación de la cadena liviana de miosina, evento que producen las proteína-quinasas dependientes del complejo Ca-calmodulina (CaMKII).

5- Simultáneamente, parte del  $\text{Ca}^{2+}$  del “cleft” (un 10%) es removido de la célula por moléculas del **intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX)** que están concentradas en la vecindad del “cleft” o diada en el SL. Esta salida es igual a la cantidad ingresada por canales L, de manera de compensar y mantener el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico estacionario. El NCX es un sistema de transporte activo secundario que intercambia 1  $\text{Ca}^{2+}$  por 3  $\text{Na}^+$  y está conducido por el gradiente de  $\text{Na}^+$  generado por la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa y por el gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es electrogénico y podría funcionar en una u otra dirección (entrando o sacando  $\text{Ca}^{2+}$ ) según el gradiente electroquímico dado por los gradientes de concentración de ambos iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana. Sin embargo, en corazón generalmente trabaja en modo de eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (modo “forward”) porque su “potencial de reversión” suele ser menor que el  $E_m$ . Por su ubicación en la diada en cercanías del RyR2 y por su alta capacidad de transporte cumple una función importante en remover  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. También funciona como eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el reposo y en fase 3 (Bers, 2001). Está en discusión si en algunas especies participa aportando algo de  $\text{Ca}^{2+}$  para la contracción durante el período de despolarización de la célula, especialmente el breve tiempo de la fase 1. Sin embargo, podría disminuirse el eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (o eventualmente favorecerse el “modo reverso” de influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ ) en una condición de acumulación de  $\text{Na}^+$  intracelular (por ejemplo, por el bloqueo de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa producido por digitálicos, ver *luego*).

6- También simultáneamente, al elevarse el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por el proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , ocurre la **recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del RS longitudinal** (isoenzima SERCA2a, que es un transporte activo primario con una estequiometría de 2  $\text{Ca}^{2+}$  : 1 ATP). La afinidad de este sistema por el  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0.1 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ) es similar a la de la TnC, por lo cual compiten por el  $\text{Ca}^{2+}$  cuando aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Por lo tanto, el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  es breve y desciende aun antes de que se alcance la máxima contracción (Figura 5). El RS recapta una cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  similar a la liberada previamente del RS más una pequeña cantidad liberada por las mitocondrias. El  $\text{Ca}^{2+}$  retomado al RS **difunde desde el RS longitudinal a la diada (RS "junctional")** y se enlaza a la proteína calsequestrina contenida en el RS, lo cual favorece la acumulación. Así, el  $\text{Ca}^{2+}$  queda listo para ser liberado por una nueva activación de los canales RyR2. El descenso de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induce la disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  de la TnC y, en presencia de nuevo ATP que reemplaza al GDP de la cabeza de miosina, ocurre la relajación por ruptura de los puentes actomiosínicos.

La velocidad máxima de la SERCA2 está regulada fisiológicamente por fosforilación de una proteína llamada fosfolamban (PLB) que también está inserta en la membrana del RS, asociada a la Ca-ATPasa a la cual le produce cierto grado de inhibición tónica cuando está desfosforilada. La PLB puede fosforilarse en dos sitios, con lo que reduce la inhibición de la SERCA2. Un sitio treonina-17 (Thr17) de la fosfolamban está fosforilado constitutivamente por la proteína-quinasa dependiente del complejo Ca calmodulina (CaMKII), por lo que el mismo  $\text{Ca}^{2+}$  activador de la contracción estimula la recaptación por la SERCA. El otro sitio serina-16 (Ser16) puede fosforilarse por una PKA activable por la cascada del receptor beta-adrenérgico.

7- En los últimos años se ha descrito una interacción funcional entre el RS y las **mitocondrias**, en el que **el RS contribuye a regular las oscilaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$** . Una pequeña fracción del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado del RS difunde hacia las mitocondrias debido a la estrecha cercanía entre ambos tipos de organelas y a la existencia de puntos de contactos. Las mitocondrias poseen un canal denominado uniporter de Ca (UCam) que permite la captación del ión conducido por el gradiente electroquímico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). La  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  libre en la matriz puede regular y activar las vías metabólicas (deshidrogenasas sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ ) que conducen a una mayor producción energética (ATP y PCr). Se ha encontrado que las mitocondrias responden con oscilaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  libre a los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos (Gunter y col., 2000; Griffiths y col., 2009). Este mecanismo permite al metabolismo mitocondrial responder a un aumento en la demanda del miocardio (por ejemplo la asociada a la liberación de catecolaminas que incrementan los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ ). La  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  es regulada principalmente por un mecanismo de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  en intercambio por 3  $\text{Na}^+$ , el NCXm que es conducido por los gradientes electroquímicos de ambos iones (Maack y col. 2006). Su funcionamiento puede alterarse con el aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$  por ejemplo por **cardiotónicos** (Liu y col., 2010; Ragone y col., 2015). Esta regulación mutua de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  entre RS y mitocondrias sugiere que se puede establecer un ciclaje desde el RyR2 al UCam, y desde el mNCX a la SERCA2a. Dicha regulación puede alterarse en deficiencias de oxígeno como el "atontamiento

miocárdico” por isquemia y reperfusión (Ragone y Consolini, 2009; Ragone y col., 2013), los estados más severos de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  por hipoxia-reoxigenación (Paillard y col., 2013) o los que conducen a arritmogénesis (Takeuchi y col., 2013).

8- Durante la **diástole o reposo** entre latidos se mantiene una  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de alrededor de 100 nM mantenida por el funcionamiento de los transportes activos de la Ca-ATPasa sarcolemal (que tiene una alta afinidad de 0.5  $\mu\text{M}$  y baja velocidad de captación) y en parte por la SERCA, y por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que puede actuar a altas y bajas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

## Homeostasis del $\text{Ca}^{2+}$ en el ciclo contracción-relajación

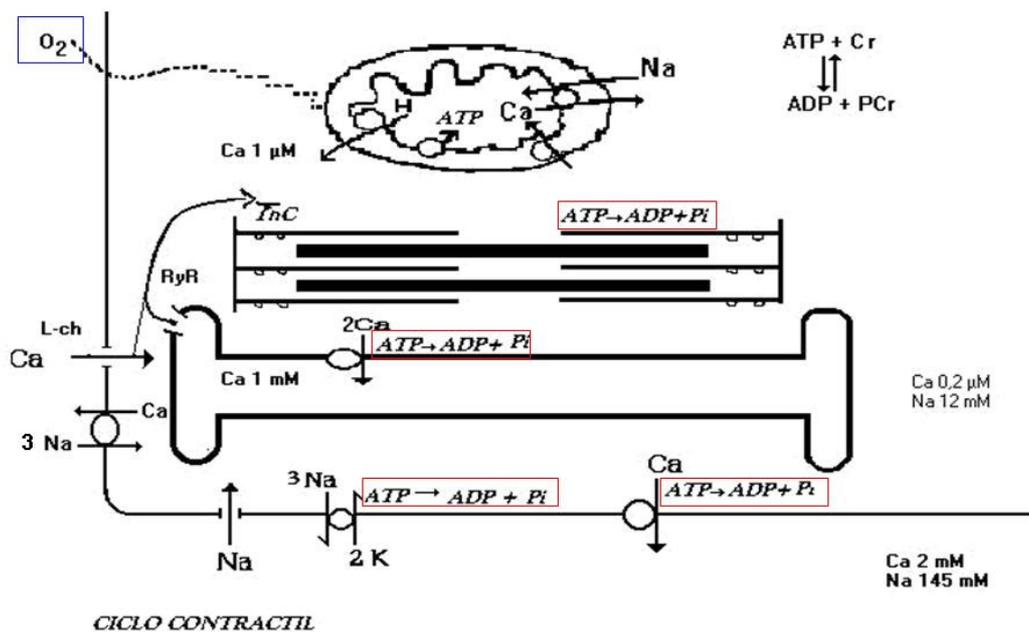


Figura 3: Esquema de los mecanismos que regulan la homeostasis de calcio y consumen energía química bajo la forma de hidrólisis de ATP. Los mecanismos se disparan por la fase 1 del potencial de acción y producen el acoplamiento excitación-contracción-relajación.

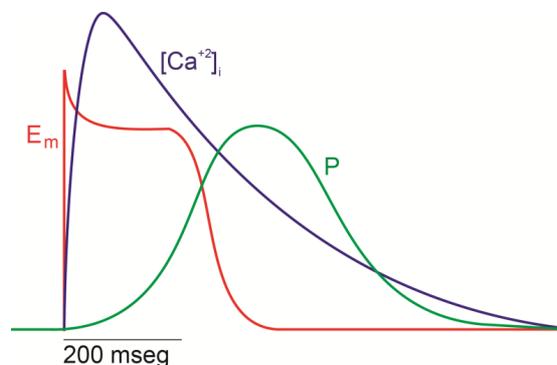


Figura 4: Esquema que representa la secuencia temporal de ocurrencia del potencial de acción (PA) de una fibra miocárdica, del transitorio de calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y la contractilidad medida como presión intraventricular desarrollada (P). Observar la duración del PA y proporcionalmente la duración de la contracción.

## Acción de las catecolaminas sobre la contractilidad cardíaca

Extrínsecamente, la principal modulación de la contractilidad cardíaca es la debida a la acción de las catecolaminas circulantes (**adrenalina**) y de nervios simpáticos (**noradrenalina, NA**). Estos agonistas interactúan fundamentalmente con el receptor  $\beta 1$  de la membrana sarcolemal (Figura 5). El mecanismo de este receptor es la activación de una proteína Gs que, mediante la hidrólisis del GTP se disocia en 2 subunidades, de las cuales la  $G_{i\alpha}$  activa a la **adenilato-ciclase (AC)**. Esta enzima cataliza la formación de AMPc a partir de ATP en la membrana sarcolemal. El AMPc formado es degradado a 5'-AMP por la fosfodiesterasa (PDE), pero antes activa a una **proteínaquinasa A (PKA)**. Ésta es capaz de fosforilar tanto proteínas contráctiles (Tn-I) como de membrana (canales de  $Ca^{2+}$  y fosfolamban). En ausencia de estímulo de PKA ocurre la desfosforilación de esas proteínas por fosfatasas. La fosforilación de la subunidad  $\alpha$  de los canales de Ca L por PKA se suma a la producida por PKC y CaMKII (dependientes de  $Ca^{2+}$ ) aumenta el número de canales que se activa en cada potencial de acción (mayor probabilidad de apertura), por lo que incrementa el influjo de  $Ca^{2+}$  hasta 3 veces el basal y por lo tanto, ejerce una **acción inotrópica positiva**.

Simultáneamente, la **fosforilación de la proteína fosfolamban por PKA** en un sitio distinto al de fosforilación de las CaMKII aumenta aún más la recaptación de  $Ca^{2+}$  por la SERCA2 (ambas aumentan la afinidad por el  $Ca^{2+}$ ), por lo que se **incrementa la velocidad de relajación**. A esta acción también contribuyen la fosforilación de la Ca-ATPasa de sarcolema, que aumenta el eflujo de  $Ca^{2+}$ , y la **fosforilación de la Tn-I**, que disminuye la afinidad de Tn-C por el  $Ca^{2+}$ . El resultado es un aumento del inotropismo (aumenta la máxima presión intraventricular desarrollada, P) con aceleración de las máximas velocidades relativas de contracción (+dP/dt/P) y de relajación (-dP/dt/P) y un acortamiento del tiempo total de la contracción (ver detalles del registro en la Figura 6).

Si bien en condiciones fisiológicas las acciones de las catecolaminas están principalmente mediadas por el receptor  $\beta 1$ , el corazón posee una baja cantidad de **receptores  $\alpha 1$** . La estimulación del receptor  $\alpha 1$  activa a la fosfolipasa C (PLC), proteína de la membrana plasmática que hidroliza al fosfolípido componente de la membrana fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2). Así se producen **1,4,5-inositoltrifosfato (IP3)** y **diacilglicerol (DAG)**. El IP3 es soluble y aumenta la liberación de  $Ca^{2+}$  del RS. El DAG activa a la proteína-quinasa C (PKC), que a su vez fosforila el canal de  $Ca^{2+}$  aumentando el influjo de  $Ca^{2+}$ . Ambos mecanismos conducen a efectos inotrópicos positivos sin efectos sobre la relajación. Sin embargo, es importante tener en cuenta que en base a la abundancia de receptores **los efectos de las catecolaminas en corazón son predominantemente de tipo  $\beta 1$** .

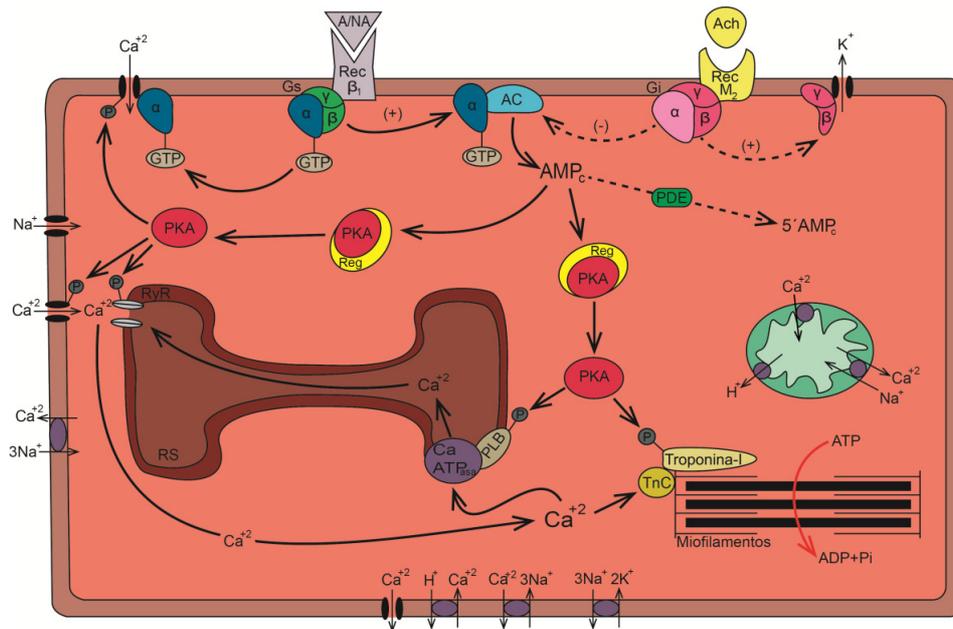


Figura 5: Esquema de una célula miocárdica donde se muestran los mecanismos participantes en la regulación ejercida por los neurotransmisores autonómicos acetilcolina (ACh) en receptor M2 y de adrenalina (Adr) o noradrenalina (NA) en receptor β1-adrenérgico. La fosfodiesterasa (PDE) también es un blanco que puede inhibirse por fármacos. Leer los mecanismos correspondientes en el texto.

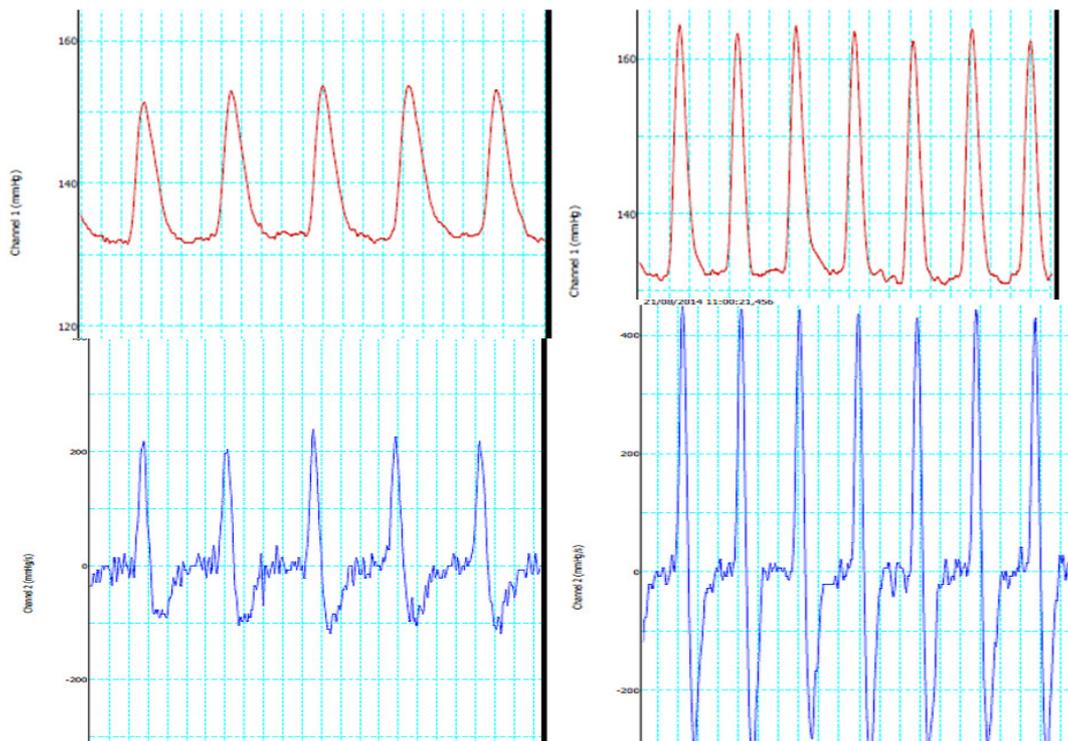


Figura 6: Registro experimental de la presión intraventricular (arriba) y la primer derivada de dicho registro (abajo) correspondientes a un corazón de rata aislado y perfundido por vía arterial. A la izquierda se muestran los registros correspondientes a una condición control (solución Krebs), y a la derecha se observan los registros del mismo corazón perfundido con solución Krebs conteniendo Adrenalina. Observar que Adrenalina aumenta la presión máxima desarrollada en la contracción (P) y las dP/dt máximas positivas (velocidad de contracción) y negativas (de relajación).

## Efectos de los cardiotónicos digitálicos en el corazón insuficiente

Los glucósidos digitálicos, de los cuales la digoxina es la única formulada en especialidad farmacéutica en la actualidad, son útiles para mejorar la contractilidad en un miocardio insuficiente. La alteración de un miocardio insuficiente es que la contractilidad se reduce por diversos factores (hipertensión arterial crónica no controlada, endocarditis, u otra alteración). Esto origina un cuadro complejo de compensaciones en el organismo que concluye con un corazón dilatado con alto volumen residual, bajo volumen sistólico y altas presiones transmuralas, con aumentos de la precarga y postcarga, y riesgos de edema periférico y/o pulmonar (Opie y Gersh, 2005). A nivel celular, el **miocardio insuficiente** tiene varias alteraciones que reducen al transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  y al inotropismo, como aumentada expresión del NCX, y reducida expresión de la SERCA2a y la PLB (Hasenfuss y Pieske, 2002). Hay una pérdida o "leak" de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS durante la diástole provocada por fosforilación del RyR2, que contribuye al aumento de la presión de fin de diástole pero reduce la carga del RS para el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  por lo cual lo reduce (para ampliar, ver Mattiazzi y col., 2010).

No existen dudas de que los glucósidos cardiotónicos inhiben a la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa sarcolemal. Se ha encontrado que su efecto inotrópico positivo es consecuencia de esa inhibición que altera el funcionamiento del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sarcolemal. El mecanismo es el siguiente: los glucósidos cardiotónicos se enlazan a un sitio receptor en la molécula de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa e inhiben su funcionamiento selectivamente durante el reposo diastólico. Por lo tanto, la  $[\text{Na}^+]_i$  aumenta, con lo cual se disminuye el gradiente de  $\text{Na}^+$  que promovía el funcionamiento "forward" de influjo de  $\text{Na}^+$ /eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y consecuentemente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se eleva en el "cleft" o dónada (Figura 7). El  $\text{Ca}^{2+}$  en exceso se acumula en el RS, evitando así la contractura diastólica. Cuando llega a la célula un PA se liberará mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, y por ende se producirá un efecto inotrópico. En síntesis, el inotropismo positivo es disparado por una disminución del eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  por el NCX. Mediante el uso de un inhibidor selectivo del intercambiador en modo reversa (influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  /eflujo de  $\text{Na}^+$ ) como el KBR7943 se encontró que esta forma no participa en la generación del inotropismo positivo al menos en la rata. Por lo tanto, la sobrecarga de  $\text{Na}^+$  no alcanzaría para invertir un significativo número de moléculas del NCX que promuevan el influjo neto de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, habría una pequeña fracción de ellos que se invierte y generan corrientes causantes de arritmias como efecto tóxico de los digitálicos a alta dosis. Más recientemente se demostró que los digitálicos ouabaína y digoxina activan a la CaMKII (p-CaMKII) que a su vez fosforila a PLB (en Thr17) y al RyR2 (en Ser2814). Esta vía origina la actividad arritmogénica disparada por altas dosis de cardiotónicos, puesto que pudo ser reducida por el inhibidor selectivo de la CaMKII llamado KN93 y exacerbada por sobreexpresión de la CaMKII. El cardiotónico aumentó el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS y la frecuencia de "sparks" de  $\text{Ca}^{2+}$  siendo éstos últimos dependientes de la CaMKII del RS. Este aumentado "leak" de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS genera las típicas postdespolarizaciones tardías de los cardiotónicos, disparadoras de arritmias (Gonano y col., 2011).

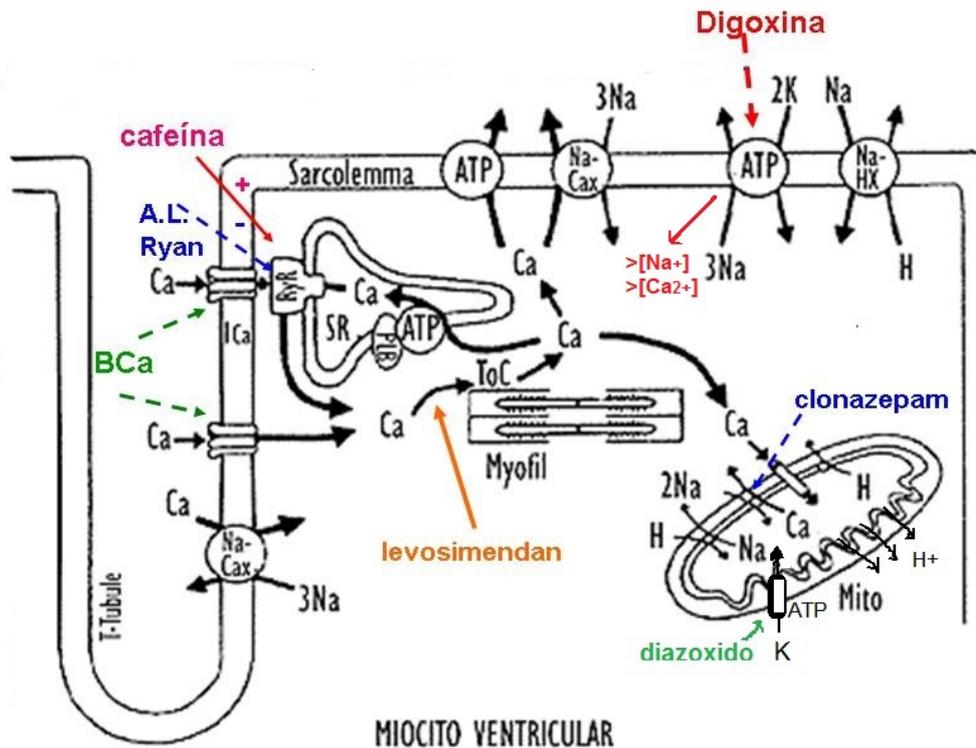


Figura 7: Esquema de una célula miocárdica donde se muestran los mecanismos de drogas que inhiben a la Na,K-ATPasa (cardiotónicos), inhiben al RyR2 (anestésicos locales, AL) o lo estimulan (cafeína 10 mM), que inhiben al mNCC (clonazepam), que estimulan al mKATP (diazóxido) o que aumentan la afinidad de TnC por  $Ca^{2+}$  (levosimendan). Ver los mecanismos y efectos correspondientes en el texto.

## Bloqueantes de los canales de $Ca^{2+}$ tipo L

Estas drogas (verapamil, diltiazem, dihidropiridinas) bloquean selectivamente los canales L por lo que disminuyen la frecuencia, la velocidad de conducción AV y la contractilidad cardíaca (Figura 7). Se dividen en dos grupos:

a- BCa cardioselectivos: Verapamil y diltiazem, se unen al canal L desde el interior celular, después de atravesar la membrana lipídica, preferentemente se unen al estado inactivado o al activado. Por ello dan un bloqueo dependiente del voltaje, es decir de la frecuencia de estimulación o tiempo de despolarización. Son más selectivos por el músculo cardíaco (dando bradicardia e inotropismo negativo), pero también bloquean al músculo liso (hipotensión).

b- BCa vasculoselectivos: son las dihidropiridinas (nifedipina, nitrendipina, amlodipina, nocardipina, etc.), se unen al canal L desde el exterior "obstruyendo" en forma competitiva el sitio de unión del  $Ca^{2+}$  para su influjo. Son más selectivos por el músculo liso que por el cardíaco a las concentraciones plasmáticas alcanzadas en terapéutica. Por ello, generan hipotensión importante, y no producen bradicardia. Al contrario, se puede desencadenar taquicardia refleja en compensación a la hipotensión.

## Fármacos que inhiben la función del retículo sarcoplásmico

Los **anestésicos locales (procaína, lidocaína, cartecaína)** pueden alterar la función sarco-reticular a concentraciones altas difícilmente alcanzadas en la terapéutica. Se ha descrito que los AL reducen la actividad del RyR y de la SERCA2, por lo cual contribuyen a producir un inotropismo negativo.

Otro fármaco que puede reducir la actividad del RyR es el dantroleno, que se ha empleado para tratar la espasticidad del músculo esquelético por inhibir al RyR en ese músculo (ver capítulo 1).

## Efectos de los inhibidores de la fosfodiesterasa

Las **metilxantinas** (cafeína, teofilina y teobromina) y la **papaverina** aumentan los niveles de AMPc por inhibir a la fosfodiesterasa (PDE), enzima que cataliza la hidrólisis del AMPc (Figura 5). En consecuencia, se producen efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos similares a los de las catecolaminas, pero de menor intensidad. Sin embargo, las xantinas tienen otros efectos como bloqueo del receptor de adenosina, que es un neurotransmisor inhibitorio. Este efecto se caracteriza por producir un leve estímulo de las vías simpáticas, lo cual genera crono- e inotropismo positivo, y aumentada sensibilidad de los miofilamentos al  $Ca^{2+}$ . Estos efectos pueden observarse a concentraciones bajas, de hasta 1 mM y son típicos de la administración in vivo. Pero particularmente la cafeína a 10 mM estimula la liberación de  $Ca^{2+}$  del RS por activar el pasaje del RyR2 a un estado abierto continuo. Por este efecto la cafeína se ha convertido en una herramienta para estimular in vitro la liberación de  $Ca^{2+}$  del RS y así estimar su contenido (Bers, 2001). Su aplicación conduce a un efecto inotrópico positivo transitorio inicial, seguido por un prolongado y marcado efecto inotrópico negativo debido a la depleción de las reservas de  $Ca^{2+}$  del RS. Esta activación del RyR2 por cafeína también conduce a un ciclaje de  $Ca^{2+}$  entre la SERCA2 y el RyR2 y las mitocondrias, que lentifica la relajación y aumenta el gasto energético cardíaco (Bonazzola y Ponce-Hornos, 1987).

Otros inhibidores de la PDE son empleados por vía intravenosa para mejorar la contractilidad cardíaca en situaciones agudas de insuficiencia grave. Se trata de **amrinona** y **milrinona**. Por otra parte, otro inhibidor de la PDE es el **sildenafil**, que se emplea como vasodilatador para la disfunción eréctil y para algunas formas de hipertensión arterial pulmonar, (ver más adelante su rol en la hipertrofia cardíaca). Pero a nivel cardíaco, todos estos inhibidores de la PDE desencadenan taquicardia importante, por la estimulación de la PKA que fosforila y activa canales de  $Ca^{2+}$ , lo cual se convierte en un efecto adverso a tener en cuenta y en una posible contraindicación para pacientes arrítmicos.

## Efectos del levosimendan

El levosimendan es un fármaco de uso parenteral que es capaz de aumentar la afinidad de la troponina C por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 7), de manera que la curva sigmoidea de contractilidad versus pCa ( $-\log [\text{Ca}^{2+}]$ ) se corre hacia la izquierda. El resultado es un inotropismo positivo, ya que a una determinada  $[\text{Ca}^{2+}]_0$  se logra mayor contractilidad. Este fármaco se usa como alternativa a las catecolaminas y a amrinona o milrinona en la emergencia de falla cardíaca, dado que su efecto inotrópico no está acompañado de efecto cronotrópico, por lo que aventaja a dichos fármacos clásicos.

## Propiedades de las drogas antiarrítmicas

Las drogas antiarrítmicas son un grupo heterogéneo de compuestos clasificados en clases denominadas del I al IV, según el mecanismo principal del fármaco. Esta clasificación fue realizada por Vaughan-Williams, y facilita la comprensión de los mecanismos de acción.

De clase I: bloquean a los canales de  $\text{Na}^+$  en estado inactivado

De clase II: bloquean a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos

De clase III: prolongan mucho el PA

De clase IV: bloquean a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en estado inactivado

Los **antiarrítmicos de clase I** bloquean la conducción de PA rápidos dependientes de las corrientes arritmogénicas de  $\text{Na}^+$  anómalas (alta frecuencia o parcialmente despolarizadas), la  $V_{m\acute{a}x}$  y la excitabilidad, reduciendo selectivamente las corrientes arritmogénicas. Es posible comprobar que un fármaco es un bloqueante de canales de  $\text{Na}^+$  evaluando la curva de excitabilidad miocárdica mínima al representar el voltaje versus la duración del estímulo umbral para desencadenar la contracción. Estos fármacos corren la curva hacia arriba y derecha, es decir generan el requerimiento de un mayor voltaje o mayor duración del estímulo para alcanzar el umbral de excitación y generar la contracción, debido a que bloquean la  $I_{\text{Na}}$  para desencadenar la fase cero, y la  $V_{m\acute{a}x}$ .

Algunas drogas de clase I actúan sobre la **corriente de  $\text{K}^+$** , alterando la duración del PA. Por ello, la clase I se clasifica en:

- **clase Ia:** bloqueantes de canales de  $\text{Na}^+$  que inhiben canales de  $\text{K}^+$  (reducen la  $I_{\text{K}}$  repolarizante), y prolongan la duración del PA, como **quinidina y procainamida**, con el riesgo de que pueden resultar arritmogénicos por alargar anormalmente el intervalo QT (ver descripción del PA miocárdico al inicio de este capítulo)
- **clase Ib:** bloqueantes de canales de  $\text{Na}^+$  que aumentan la corriente de  $\text{K}^+$ , aceleran la fase 3 y acortan el PA, como **lidocaína, fenitoína y mexiletina**.
- **Clase Ic:** bloqueantes de canales de  $\text{Na}^+$  que no modifican apreciablemente la corriente de  $\text{K}^+$  ni la duración del PA, por ejemplo **propafenona y flecainida**,

A pesar de esas diferencias de las subclases, todos los bloqueantes de canales de  $\text{Na}^+$  **alargan más el período refractario efectivo que la duración del PA** (mayor relación PRE/DPA), con lo que todos ejercen un aumento de la refractariedad que reduce la posibilidad de aparición de estímulos anormales (Figura 8). El mecanismo por el que los antiarrítmicos del grupo I (bloqueantes de los canales de  $\text{Na}^+$ ) actúan es la incorporación inespecífica de droga en la bicapa lipídica, lo cual altera la cinética del canal de  $\text{Na}^+$ . El grado de bloqueo depende de propiedades fisicoquímicas de estas drogas como pK, lipofilicidad, tamaño molecular, etc.

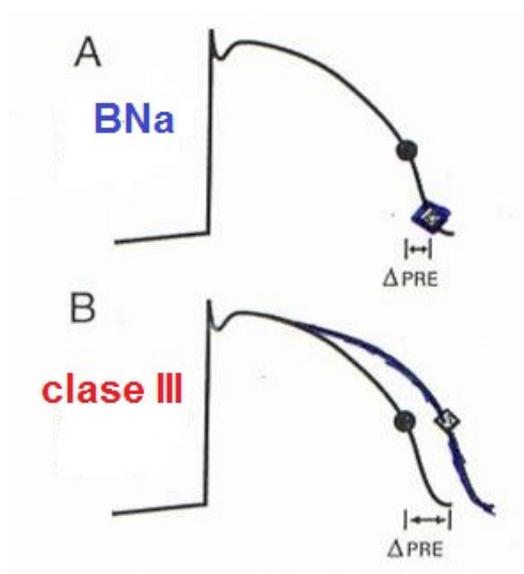


Figura 8: Esquema del potencial de acción (PA) miocárdico mostrando la prolongación del período refractario efectivo (PRE) que se produce por antiarrítmicos que inhiben a la corriente de  $\text{Na}^+$  (BNa) típico de los fármacos de clase I (A), y los que prolongan la duración del PA (clase III) generalmente por inhibir a las corrientes de  $\text{K}^+$  repolarizantes (B). Considerar que la amiodarona y dronedarona comparten ambos mecanismos, por lo que se suman ambos factores de prolongación del PRE.

Los **antiarrítmicos de clase III** son un grupo heterogéneo de fármacos (**amiodarona, dronedarona, sotalol, bretilo**), que tienen en común la propiedad de prolongar mucho la duración del potencial de acción miocárdico, por mecanismos antes explicados. Esa característica es común a todos, a pesar de que algunos como amiodarona y dronedarona inhiben a las corrientes de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , y otros son también antiadrenérgicos (sotalol y bretilo). El efecto sobre la duración del PA puede evaluarse fácilmente por aplicación de un segundo estímulo (bigemínico) en la medición contráctil, y la respuesta graficada en función del tiempo de demora entre el primer y el segundo estímulo. Un antiarrítmico clase III será capaz de aumentar el mínimo período de tiempo necesario para visualizar la respuesta a los 2 estímulos. Esto es debido a que prolongan la duración del PA y aún más al PRE (Figura 8B).

Como se explicó en la sección del potencial de acción miocárdico, en los tejidos de respuesta lenta (nódulos SA y AV) los **bloqueantes del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (grupo IV, BCa)** como **verapamil** y **diltiazem** actúan en forma dependiente del voltaje y de la frecuencia de estimulación, por enlazarse y bloquear al estado inactivo del canal L. Por ello, son ideales para re-

ducir la frecuencia marcapaso y la velocidad de conducción AV, prolongando el período refractario. Esto mejora la función de filtro de estímulos ectópicos en el nódulo AV, preservando al ventrículo de una arritmia proveniente de la región auricular o supraventricular. Por otra parte, los BCa anulan las post-despolarizaciones tempranas o tardías arritmogénicas ventriculares, debido a que dichas anomalías son mediadas por canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo entonces útiles en las re-entradas.

Otro fármaco de uso en la emergencia de arritmia es la **adenosina**, que se aplica en forma parenteral intravenoso. Endógenamente, este compuesto es un metabolito del ATP que resulta esencial en la vía de autorregulación del tono coronario miocárdico, puesto que a mayor demanda cardíaca se intensifica la síntesis de adenosina por degradación del ATP, y ella migra desde el miocito a las coronarias para causar vasodilatación. De esta forma se coordina que a mayor demanda cardíaca haya mayor suministro de oxígeno. El mecanismo de acción es la activación de los receptores A1 que se acopla a una proteína Gi. Consecuentemente por hidrólisis del GTP se desdoblán las subunidades  $\text{Gi}\alpha$  y  $\text{Gi}\beta\gamma$  la primera de las cuales inhibe a la adenilato ciclasa (AC) y la segunda activa a los canales de  $\text{K}^+$ , provocando hiperpolarización y vasodilatación. A nivel del miocardio y los nódulos SA y AV la adenosina también provoca hiperpolarización por la misma vía (similar a la del M2 en la Figura 5). Esto conduce a una reducción de las arritmias graves y reversión de la alteración despolarizante que dispara el umbral arritmogénico, por ejemplo la provocada por isquemia. Se emplea vía IV en la emergencia de taquicardia supraventricular paroxística.

## Fármacos cardioprotectores en la isquemia y reperfusión cardíacas

Cuando la irrigación coronaria se reduce por obstrucción o vasoespasmo, el miocardio recibe menos oxígeno y reduce su metabolismo aeróbico esencial para la resíntesis del ATP y PCr necesarios para abastecer de energía a la célula. Entonces, ocurren varios cambios en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  que conducen a una menor o mayor disfunción contráctil, dependiendo de la duración de la isquemia. A partir del conocimiento de esas alteraciones se pueden formular estrategias terapéuticas para prevenir o revertir la disfunción (Consolini y col., 2014).

La Figura 9 muestra un registro de los cambios contráctiles y energéticos (como flujo de calor liberado por los procesos exotérmicos cardíacos: hidrólisis de ATP por bombas y miofilamentos, unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a sitios específicos como TnC, y metabolismo mitocondrial). Cuando la perfusión cesa y el oxígeno se reduce, caen abruptamente la contractilidad y las reservas energéticas, en parte porque se activa una corriente de  $\text{K}^+$  dependiente de ATP (KATP) que acorta la duración del PA y se reduce el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en fase 2 (Cole y col. 1991). Dependiendo de la duración de la isquemia, durante la reperfusión (R) se recupera la contractilidad parcialmente y el corazón se hace menos económico porque consume más energía y libera más calor para desarrollar una contractilidad menor a la inicial. Hablamos entonces de un “corazón atontado” (o proceso de “*stunning*”).

Entre los mecanismos aparece la alteración de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ . En la **isquemia** se reduce bruscamente la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que el RS retiene su carga, y el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  y la contractilidad se reducen. Además, la reducción del ATP reduce la remoción activa del  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  celular, por lo cual se inicia la contractura diastólica.

Cuando ocurre la **reperfusión**, el metabolismo y los niveles de ATP se restituyen, se recuperan la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa y el gradiente de  $\text{Na}^+$ . Esto favorece la activación del eflujo de los  $\text{H}^+$  acumulados durante la etapa hipóxica por la vía del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Y eso favorece el eflujo de  $\text{Na}^+$  por el NCX, lo cual conlleva a un brusco reingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  y liberación brusca del  $\text{Ca}^{2+}$  del RS proporcional a su carga (Valverde y col. 2010). Así, ocurre la máxima contractura diastólica durante el inicio de la R. Pero gradualmente la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa restituye el gradiente de  $\text{Na}^+$  y el funcionamiento “forward” del NCX, removiendo el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Así lentamente puede recuperar el tono diastólico, los niveles de ATP y de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, de modo que se recupera el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando la isquemia es breve, el miocardio recupera parcialmente su contractilidad pero reduce su economía por aumentar el gasto energético (miocardio atontado). Esto se atribuye a la necesidad de manejar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevada, ya sea por los transportadores y/o por las mitocondrias que aumentan el metabolismo. Los **fármacos cardioprotectores** frente al atontamiento son aquellos que reducen la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica como los BCa (diltiazem, verapamil), o los que reducen la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (diazóxido, un abridor del mKATP que reduce el gradiente para la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial) (Ragone y col., 2009). En ciertas condiciones, un leve aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  por bloqueo del mNCX ha sido benéfico, pero hay un límite por encima del cual se dispara la disfunción (Consolini y col., 2014; Ragone y col., 2015). Es bien conocido que si las mitocondrias se sobrecargan de  $\text{Ca}^{2+}$  se dispara la activación del poro de transición de permeabilidad (mPTP) con lo cual las mitocondrias pierden contenido de ciertas proteínas y eso conduce a una más pronunciada disfunción. Los mPTP pueden bloquearse por ciclosporina-A en modo bastante selectivo. Sin embargo, las estrategias de cardioprotección están aún en etapa experimental, empleándose antioxidantes, fitoestrógenos (Colareda y col., 2016) como preventivos del daño isquémico celular. En la terapéutica clínica se emplean antiagregantes como preventivos de obstrucción coronaria y beta-bloqueantes (BB) para reducir el gasto cardíaco de pacientes que ya han padecido un ataque de angor.

## Fármacos en la hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca es una respuesta maladaptativa temprana a diversos factores que puede evolucionar a insuficiencia. Puede generarse a raíz de sobrecarga hemodinámica, mutaciones de proteínas sarcoméricas o pérdida de masa contráctil luego de procesos isquémicos como infarto. De todas maneras independientemente de la causa a la que responda, la necesidad de preservar la fracción de eyección y por ende la funcionalidad del corazón lleva a un incremento en el estrés de pared ventricular que promueve un remodelamiento de la estructura cardíaca y lleva a

una dilatación de las cámaras. Este remodelamiento comprende un incremento en el tamaño de los miocitos cardíacos, un progreso hacia apoptosis de los mismos, un incremento en la fibrosis intersticial a raíz de cambios en otros componentes del corazón como fibroblastos y matriz extracelular. Se ha demostrado que la generación de esta respuesta obedece a mecanismos autócrino-parácrinos que desencadenan una cascada intracelular e involucra vías de transcripción activadas por sobrecarga de  $\text{Ca}^{+2}$  (como Calcineurina/NFAT). La necesidad de prevenir la generación o revertir el estado hipertrófico una vez instaurado llevó al estudio de las vías de señalización que pueden desencadenar estas respuestas y con ello, a la búsqueda de blancos terapéuticos para el desarrollo farmacológico.

### ***Blanco terapéutico: Angiotensina II (Ang II)***

La Ang II, componente del sistema RAA, ha sido estudiada ampliamente por su carácter pro hipertensivo (a través de su receptor AT1). No obstante, en corazón Ang II es capaz de inducir crecimiento celular miocárdico e hiperplasia de fibroblastos cardíacos (Sadoshima e Izumo 1993), efectos que pueden prevenirse con el empleo de fármacos bloqueantes del receptor AT1, denominados genéricamente ARA-2 como **losartán, telmisartán, irbesartán**. Experimentalmente en trabéculas aisladas de ventrículo, Ang II promueve un incremento en la tensión desarrollada que es independiente de la activación  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgica (Moravec y col. 1990), mostrando que se debe a la activación de su receptor AT1 y está mediado por  $\text{Ca}^{+2}$ . Por otra parte, el miocardio sometido a estiramiento es capaz de liberar Ang II al medio extracelular y generar esta respuesta autócrina. Por ello, los beneficios de losartán en la prevención y reversión de la hipertrofia miocárdica y fibroblástica así como en el remodelamiento miocárdico, se deben principalmente a acciones directas en corazón (Xu y col. 2009).

### ***Blanco terapéutico: Receptor de mineralocorticoide MR***

Como parte del sistema RAA, la Aldosterona (Ald) se ha vinculado principalmente con la generación de respuestas en riñón mediadas por la síntesis de proteínas que promueven el incremento en la reabsorción de  $\text{H}_2\text{O}$  y control de la excreción de  $\text{Na}^+$ . Clínicamente, las drogas antagonistas del receptor MR de Aldosterona (como **espironolactona y eplerenona**) han tenido efectos benéficos en tratamientos destinados a evitar el desarrollo de fibrosis cardíaca y vascular, la progresión a insuficiencia cardíaca e hipertensión resistente (Ferrario y Schiffrin, 2015). Análogamente a lo que sucede con los ARA-2, la efectividad de los inhibidores del MR responde a acciones directas sobre el músculo cardíaco. En efecto, se ha demostrado activación de los receptores MR en músculo cardíaco sometido a estiramiento, los cuales por un mecanismo no genómico promueven la generación de especies reactivas del oxígeno e inducción de quinasas redox-sensibles que culminan en una sobrecarga de  $\text{Ca}^{+2}$  (Cingolani y col., 2013). Cuando el músculo cardíaco (por ejemplo el papilar aislado) se somete a estiramiento experimenta un aumento bifásico en la fuerza desarrollada: un primer incremento agudo, explicable por la ley de Frank-Starling, que se corresponde con una mayor sensibilidad de las fibras contráctiles al  $\text{Ca}^{+2}$  y un segundo de desarrollo gradual denominado segunda fase de fuerza (SFF) que involucra una mayor carga de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólica. Esta SFF

puede cancelarse tanto con losartán como por **epirenona** y **espironolactona** por lo que involucra tanto al receptor AT1 de Ang II como al MR de Ald y el sostenimiento en el tiempo de dicho estímulo puede dar lugar al desarrollo de **hipertrofia cardíaca**.

#### **Blanco terapéutico: intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ miocárdico NHE1**

El NHE1 es una proteína integral de membrana cuya función principal es la regulación del pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ). La regulación del  $\text{pH}_i$  por acción del NHE1 trae aparejado un incremento en la  $[\text{Na}^+]_i$ , el cual en condiciones fisiológicas es removido eficientemente por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa. Sin embargo, la hiperactividad del intercambiador genera un incremento sostenido en la  $[\text{Na}^+]_i$  suficiente para originar una elevación de la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  a través del funcionamiento en modo reversa del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  (NCX) (Figura 7). La inhibición crónica de la actividad del NHE1 con inhibidores derivados del diurético amilorida (**cariporide**, **eniporide** y **zoniporide**) revierte los signos de daño tisular y apoptosis en el tejido **hipertrófico**, como así también mejora la función del tejido cardíaco luego de injurias como **isquemia y reperfusión e infarto**. A pesar de los beneficios demostrados en diversos modelos experimentales, en los estudios clínicos la evaluación de dichos inhibidores como terapéutica en procesos isquémicos cardiovasculares no generó los resultados esperados, señalando que el bloqueo total de la actividad del NHE1 sería la causa de la falta de efectividad aparente y del surgimiento de efectos adversos no deseados de origen vascular (Cingolani y col., 2013). Entonces, tratando de preservar la función homeostática basal del NHE1, se diseñaron nuevas estrategias de inhibición tendiendo a aplacar la sobreactivación ocurrida en estos procesos patológicos. Esta sobreactivación genera un aumento en la fosforilación del extremo citosólico del transportador NHE1, y por ende la prevención de la fosforilación o la inducción de la desfosforilación de dichos residuos es un potencial blanco terapéutico. En ese marco, los inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa 5A (PDE5A, enzima que cataliza la conversión de GMPc en 5'-GMP), son capaces de inducir la actividad de fosfatasa como PP2A que llevan a la desfosforilación del NHE1 (Díaz y col. 2010) reduciendo así la hipertrofia cardíaca. La aplicación terapéutica más comúnmente asociada a los inhibidores de la PDE5A (**sildenafil**, **tadalafil**, **vardenafil**) es el tratamiento de la disfunción eréctil. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito su utilización en otras patologías, como por ejemplo **insuficiencia cardíaca crónica e hipertensión pulmonar**. Particularmente en corazón, se demostró que sildenafil es capaz de prevenir apoptosis en modelos de cardiotoxicidad crónica, además de ser efectivo en la prevención de la generación de **hipertrofia** y el mejoramiento de la función ventricular de corazones sometidos a **infarto** mediante un mecanismo que se atribuye primariamente a la inhibición del NHE1 (Perez y co, 2007).

#### **Blanco terapéutico: Anhidrasa Carbónica (AC)**

La AC es la enzima que cataliza la disociación del ácido carbónico en  $\text{CO}_2$  y agua. Las variaciones de pH que devienen de su actividad han llevado a plantear la posibilidad de

que dicha enzima estuviera estrechamente vinculada a los mecanismos encargados de la homeostasis del  $\text{pH}_i$  (como NHE1 y el cotransporte  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ) y por ende a la regulación de la  $[\text{Na}^+]_i$  e indirectamente, como se explicó anteriormente, a la de  $\text{Ca}^{+2}$ . En efecto, se ha demostrado la existencia de una interacción física y funcional entre la AC y el NHE1 (Vargas y col. 2013), tal que la inhibición de la AC (con **acetazolamida** o **ethoxzolamida**) es capaz de modular negativamente la actividad del NHE1 y reducir la SFF en la que éste cumple un rol fundamental. La acción moduladora de la actividad del NHE1 radica básicamente en su función facilitadora de protones a la AC, aunque su interacción física sugiere una regulación mayor que vincularía a la fosforilación del mismo. En ese aspecto, los inhibidores de la AC son fármacos efectivos para prevenir el desarrollo de hipertrofia en varios modelos celulares y animales (Alvarez y col., 2007, Vargas y col., 2016).

### ***Blanco terapéutico Calcineurina y vía NFAT***

Calcineurina es una fosfatasa Serina/treonina activable por el complejo  $\text{Ca}^{+2}$ -Calmodulina, que al activarse desfosforila y activa al factor de transcripción nuclear derivado de células T (NFAT), el cual migra al núcleo para desencadenar transcripción génica (Wilkins y col. 2004). Se activa más por sobrecarga de  $\text{Ca}^{+2}$  por lo cual sería mediadora en la generación de hipertrofia. Se ha visto que modula la expresión de numerosos genes relacionados con la reprogramación fetal en hipertrofia patológica. Como paso previo a tal reprogramación de genes, la inhibición de la ruta desencadenada por calcineurina con **ciclosporina-A** (Cys-A) parece un blanco terapéutico razonable. En efecto, en ratones transgénicos con disfunción sarcomérica que desarrollan cardiomiopatía dilatada, la administración de Cys-A previene el desarrollo de hipertrofia. También resultó efectiva en la prevención de la hipertrofia debida a sobrecarga de presión, aunque no es una droga que actualmente tenga esta indicación (Olson y Molkentin 1999).

## **Evaluación experimental de fármacos sobre músculo cardíaco**

Experimentalmente, el estudio de los efectos de fármacos sobre las funciones cardíacas puede abordarse mediante diferentes tipos de preparados:

- a- Corazón aislado y perfundido mediante la técnica de Langendorff: se perfunden las coronarias (con solución Krebs como nutriente) a través de la arteria aorta en forma retrógrada (técnica de Langendorff). Se registra la presión intraventricular (P) isovolumétrica desarrollada por el ventrículo izquierdo mediante un globito de látex regulado por pasos hasta volumen óptimo conectado a un transductor de presión y a un polígrafo. Es útil como modelo de contractilidad del corazón entero, porque registra la presión intraventricular y se nutre por la vía fisiológica arterial. Además, es el modelo óptimo para estudiar el fenómeno de isquemia-reperusión porque permite interrumpir la perfusión coronaria total o parcialmente. En nuestro laboratorio también estudiamos la ener-

gética cardíaca incorporando el corazón perfundido en un sistema calorimétrico para registrar el flujo de calor durante todo el experimento (Ponce-Hornos y col., 1982; Consolini y col., 2007).

Las consecuencias de la isquemia y reperfusión (I/R) son: un aumento de la presión diastólica (contractura) durante la isquemia y aún más durante la reperfusión, una reducción de la recuperación de la contractilidad durante la R, y en ciertos casos se generan arritmias durante R. Energéticamente, en la isquemia hay una caída del flujo de calor asociada a la brusca disminución del metabolismo aeróbico mitocondrial. Al inicio de la R aumenta mucho el flujo de calor por la reactivación de los mecanismos que remueven activamente el  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en citosol (SERCA, NCX, UCam, Ca-ATPasa sarcolemal). El calor proviene de la hidrólisis exotérmica del ATP consumido para mantener esos transportes y el ATP hidrolizado por el sistema actomiosínico durante la contractura diastólica y la recuperación contráctil (Figura 9). Con el transcurso de R, la presión diastólica se reduce y la contractilidad aumenta en diversos grados según el tiempo de la isquemia. Si la isquemia es relativamente breve, la R da lugar a un “**corazón atontado**” con reducida economía contráctil (relación entre la contractilidad y el flujo de calor que estima la energía consumida). Si la isquemia es muy prolongada, se disparan procesos de apoptosis (por acumulación citosólica y mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  y de especies reactivas de oxígeno, ROS) y el tejido se contractura en forma irreversible reduciendo casi a cero su flujo de calor por el cese del metabolismo y de la hidrólisis de ATP (**infarto**).

- b- Aurículas aisladas con frecuencia espontánea: se sumergen en una solución nutriente (Krebs) y se registra la contracción mediante un transductor de fuerza isométrico. Puede evaluarse la frecuencia contando el número de contracciones por unidad de tiempo. Es útil para estudiar efectos en la frecuencia espontánea o en la contractilidad, y para analizar efectos de catecolaminas porque difícilmente genera arritmias (Kitchen, 1984).
- c- Papilar aislado: se prepara y mide similarmente al preparado de aurículas, pero carece de automatismo y permite evaluar fuerza isométrica y tensión parietal, porque sus fibras son longitudinales y paralelas, alineadas con la dirección de medida del transductor. Se puede trabajar con pequeños volúmenes de solución Krebs y de fármacos, pero no permite generar un modelo de isquemia/reperfusión porque debe estar continuamente superfundido. Gracias a su escaso diámetro y volumen permite estimar cambios en la  $[\text{Ca}^{+2}]$  citosólica empleando la carga del papilar con un indicador fluorescente sensible al mismo (como Fura-2 o Fluo-4) para luego visualizar en un microscopio de fluorescencia las zonas e intensidad relativa de fluorescencia (en la célula).

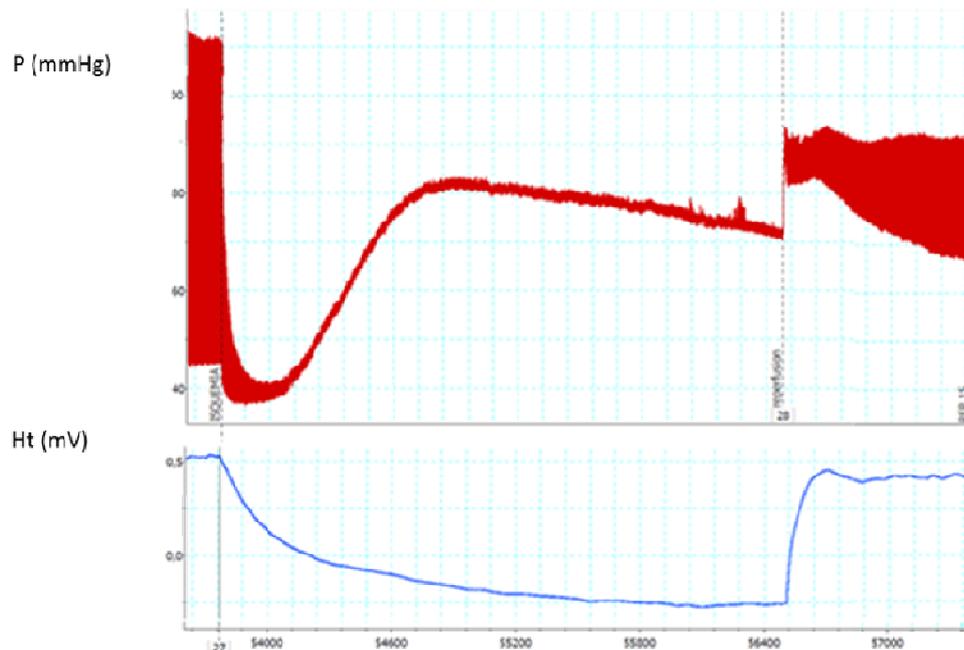


Figura 9: Registro obtenido en nuestro laboratorio a partir de un corazón de rata aislado y perfundido antes y durante la isquemia (30 minutos) y reperusión (I/R). Arriba se muestra la presión intraventricular (P) y abajo el flujo de calor (Ht). Notar que durante la isquemia caen bruscamente la contractilidad y el Ht, pero se produce contractura diastólica; y durante la R se recupera gradualmente la contractilidad después de aumentar aún más la contractura diastólica. Ver en el texto los mecanismos responsables de tales cambios por alteración de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ .

d- Cardiomiocitos aislados en un medio nutriente y con enzimas como colagenasa y proteasa para separarlas de la matriz extracelular de colágeno y glicoproteínas: se registra acortamiento mediante cámara de video y/o potenciales de acción (PA) o corrientes eléctricas con microelectrodos. También permite evaluar cambios en las  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre en diversos compartimentos celulares con el empleo de fluoróforos (indicadores que emiten fluorescencia al complejarse con el  $\text{Ca}^{2+}$  libre) tales como Fura-2 y Fluo-4 para el citosólico, y Rhod-2 cargado en frío para las mitocondrias. Es útil para estudiar mecanismos de fármacos en esas variables y en un sistema simplificado, pero no reproduce situaciones como la I/R, ya que no admite la isquemia, aunque ésta se ha simulado químicamente, mediante venenos mitocondriales y anoxia.

## Bibliografía

Alvarez, B. V., D. E. Johnson, D. Sowah, D. Soliman, P. E. Light, Y. Xia, M. Karmazyn, Casey, J. R. (2007). Carbonic anhydrase inhibition prevents and reverts cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Physiology* 579(Pt 1), 127-145.

- Bers, D. M. (2001). *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. 2nd edn. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *Journal of Physiology* 499 (2), 291-306.
- Bonazzola, P., Ponce-Hornos, J. E. (1987). Effects of caffeine on energy output of rabbit heart muscle. *Basic Research in Cardiology* 82(5), 428-436.
- Cingolani, H. E., Perez, N. G., Cingolani, O. H. Ennis, I. L. (2013). The Anrep effect: 100 years later. *American Journal of Physiology- Heart Circulation Physiology* 304(2), H175-H182.
- Colareda, G. A., Ragone, M. I., Consolini, A. E. (2016). Sex differences in the mechano-energetical effects of genistein on stunned rat and guinea-pig hearts. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* 43, 102-115.
- Cole, W. C., Pherson, C. D., Sontag, D. (1991). ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circulation. Research* 69, 571-581.
- Consolini, A. E., Ragone, M. I., Conforti, P., Volonté, M. G. (2007) Mitochondrial role in ischaemia-reperfusion of rat hearts exposed to high-K<sup>+</sup> cardioplegia and clonazepam: energetic and contractile consequences. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 85, 483-496.
- Consolini, A. E., Ragone, M. I., Colareda, G. A., Bonazzola, P. (2014). "Insights on mitochondrial role in cardiac stunning and cardioprotection: an energetic approach". En: "Mitochondrial dysfunction: Risks factors, Symptoms and Treatment options", Kinberly L. Anderson, editor. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Diaz, R. G., Nolly, M. B., Massarutti, C. Casarini, M. J. Garciarena, C. D. Ennis, I. L. Cingolani H. E., Perez, N. G. (2010) Phosphodiesterase 5A inhibition decreases NHE-1 activity without altering steady state pH(i): role of phosphatases. *Cellular Physiology and Biochemistry* 26(4-5), 531-540.
- Ferrario, C. M., Schiffrin E. L. (2015). Role of mineralocorticoid receptor antagonists in cardiovascular disease. *Circulation Research* 116(1), 206-213
- Gonano, L. A., Sepúlveda, M., Rico, Y., Kaetzel, M., Valverde, C. A., Dedman, J., Mattiazzi, A., Vila-Petroff, M. (2011). Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. *Circulation Arrhythmia Electrophysiology* 4(6), 947-957.
- Griffiths, E. J. (2009). Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46, 789-803.
- Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R., Gunter, K. (2000). Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*. 28, 285-296.
- Hasenfuss, G., Pieske, B. (2002). Calcium cycling in congestive heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34(8). 951-969
- Kitchen, I. (1984). *Textbook of in vitro practical pharmacology*. London: Blackwell Scientific Publications.
- Langer, G. A. (1997). *The Myocardium*. 2nd Edition. London: Academic Press.

- Liu, T., Brown, D. A., O'Rourke, B. (2010). Role of mitochondrial dysfunction in cardiac glycoside toxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49, 728–736.
- Maack, C., Cortassa, S., Aon, M. A., Ganesan, A. N., Liu, T., O'Rourke, B. (2006). Elevated cytosolic Na<sup>+</sup> decreases mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circulation Research* 99, 172–182.
- Mattiazzi, A., Mundiña-Weilenmann, C., Vittone, L., Vila-Petroff, M. Acoplamiento excitomotor en el corazón normal y patológico. En: Gelpi, R. J. y Donato, M. (2010). *Fisiopatología cardiovascular. Bases racionales para la terapéutica*. Buenos Aires: Editorial Corplus.
- Mattiazzi, A., Argenziano, M., Aguilar-Sanchez, Y., Mazzocchi, G., Escobar, A. L. (2015). Ca<sup>2+</sup> Sparks and Ca<sup>2+</sup> waves are the subcellular events underlying Ca<sup>2+</sup> overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 79, 69-78.
- Moravec, C. S., Schluchter, M. D., Paranandi, L., Czarska, B., Stewart, R. W. Rosenkranz, E., Bond, M. (1990). Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation* 82(6), 1973-1984.
- Olson, E. N., Molkentin, J. D. (1999). Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition: hope or hype? *Circulation Research* 84(6), 623-632.
- Opie, L. H., Gersh, B. J. (2005). *Fármacos para el corazón*. 6ta edición. Madrid: Elsevier Inc. España.
- Paillard, M., Tubbs, E., Thiebaut, P. A., Gomez, L., Fauconnier, J., Da Silva, C. C., Teixeira, G., Mewton, N., Belaidi, E., Durand, A., Abrial, M., Lacampagne, A., Rieusset, J., Ovize, M. (2013). Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* 128, 1555-65.
- Perez, N. G., Piaggio, M. R. Ennis, I. L. Garcíarena, C. D. Morales, C., Escudero, E. M., Cingolani, O. H., Chiappe de Cingolani, G., Yang X. P., Cingolani H. E. (2007). Phosphodiesterase 5A inhibition induces Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger blockade and protection against myocardial infarction. *Hypertension* 49(5), 1095-1103.
- Ponce-Hornos, J. E., Ricchiuti, N. V., Langer, G. A. (1982). On-line calorimetry in the arterially perfused rabbit interventricular septum. *American Journal of Physiology- Heart Circulation Physiology* 243, H289-H295.
- Ragone, M. I., Bonazzola, P., Colareda G. A., Consolini, A. E. (2015). Cardioprotection of hyperthyroidism on the stunned rat heart under ischaemia/ reperfusion: energetics and role of mitochondria. *Experimental Physiology* 100, 680–97.
- Ragone, M. I., Consolini, A. E. (2009). Role of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transporters in the high-[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> cardioprotection of rat hearts under ischemia and reperfusion: a mechano-energetic study. *J Cardiovascular Pharmacology* 54, 213-222.
- Ragone, M. I., Torres, N. S., Consolini, A. E. (2013). Energetic study of cardioplegic hearts under ischaemia/reperfusion and [Ca<sup>(2+)</sup>] changes in cardiomyocytes of guinea-pig: mitochondrial role. *Acta Physiologica* 207, 369-385.

- Sadoshima, J., Izumo, S. (1993). Mechanotransduction in stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *Journal of Receptor Research* 13(1-4), 777-794.
- Schulz, R., Triggle, C. R. (1994). Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends in Pharmacological Sciences* 15, 255-259.
- Takeuchi, A., Kim, B., Matsuoka, S. (2013). The mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes. *Science Reports* 3, 2766.
- Valverde, C. A., Kornyejev, D., Ferreiro, M., Petrosky, A. D., Mattiazzi, A., Escobar A. L. (2010). Transient Ca<sup>2+</sup> depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovascular Research* 85, 671–680.
- Vargas, L. A., Diaz, R. G., Swenson, E. R., Perez N. G., Alvarez, B. V. (2013). Inhibition of carbonic anhydrase prevents the Na(+)/H(+) exchanger 1-dependent slow force response to rat myocardial stretch. *American Journal of Physiology- Heart Circulation Physiology* 305(2), H228-H237.
- Vargas, L. A., Pinilla, O. A., Diaz, R. G., Sepulveda, D. E., Swenson, E. R., Perez N. G., Alvarez, B. V. (2016). Carbonic anhydrase inhibitors reduce cardiac dysfunction after sustained coronary artery ligation in rats. *Cardiovascular Pathology* 25(6), 468-477.
- Wilkins, B. J., Dai, Y. S., Bueno, O. F., Parsons, S. A., Xu, J., Plank, D. M., Jones, F., Kimball, T. R., Molkentin, J. D. (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circulation Research* 94(1), 110-118.
- Xu, F., Mao, C., Hu, Y., Rui, C., Xu, Z., Zhang, L. (2009). Cardiovascular effects of losartan and its relevant clinical application. *Current Medicinal Chemistry* 16(29), 3841-3857.

## CAPÍTULO 3

# Farmacodinamia del músculo liso en general y gastrointestinal

*Alicia E. Consolini y Germán A. Colareda*

*..Hacer de tripas corazón, fenómeno de conversión visceral que solo en la especie humana ha sido observado.*  
JOSÉ SARAMAGO. Ensayo sobre la ceguera

### **Mecanismos de contracción y relajación del músculo liso visceral: efectos de agonistas**

El músculo liso (ML) funciona de manera involuntaria y forma parte de órganos como el útero, vejiga, bronquios, así como también del tracto gastrointestinal y de los vasos sanguíneos, entre otros. A pesar de cumplir diferentes funciones en el organismo, el mecanismo contráctil del músculo liso es el mismo en los diferentes tejidos, aunque hay mecanismos endoteliales en los vasos sanguíneos que afectan el tono muscular, por lo que se tratarán en un capítulo aparte. Al igual que en los músculos esquelético y cardíaco, la contracción se inicia ante un incremento en la  $[Ca]_i$  desde el nivel de reposo del orden de  $10^{-7}$  M hasta aproximadamente  $10^{-5}$  M. Ingresa principalmente por canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje o a la estimulación de un receptor por un agonista. En el músculo liso, las miofibrillas no están ordenadas en miofilamentos longitudinales como en el estriado, sino que forman conglomerados de distribución heterogénea, y el mecanismo contráctil se regula de modo diferente al del músculo estriado. El  $Ca^{2+}$  en citosol se une a una proteína citosólica llamada calmodulina formando un complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina. Este complejo estimula la actividad enzimática de la quinasa de la cadena liviana de miosina (KCLM) que fosforila justamente a la cadena liviana de la miosina. Esto provoca la interacción de la cabeza de miosina con la actina, desarrollando el proceso contráctil. Cuando la  $[Ca]_i$  desciende a cerca de  $10^{-7}$  M por remoción activa del  $Ca^{2+}$ , el complejo Ca-calmodulina-KCLM se disocia, la KCLM pasa a su forma inactiva, y entonces predomina la acción de las fosfatasas, que defosforilan a la miosina produciéndose la relajación. El descenso de la  $[Ca]_i$  es debido al predominio de los mecanismos de remoción de  $Ca^{2+}$  citosólico por sobre los mecanismos de influjo o liberación de  $Ca^{2+}$  cuando desaparece el estímulo que activó a los canales de  $Ca^{2+}$ .

## Actividad eléctrica del músculo liso visceral

El registro con microelectrodos del potencial de membrana del ML revela valores que van desde -60 mV hasta -25 mV, según el ML considerado. La diferencia de potenciales de membrana entre diversas vísceras se debe a la desigual participación de transportadores que regulan los niveles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPasa, y varias corrientes iónicas activadas en condición basal, como las de  $\text{K}^+$  y del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). Los ML exhiben diferentes comportamientos en relación a la actividad eléctrica de la membrana y la contracción muscular. Los músculos lisos del intestino, útero, vaso deferente y vena porta entre otros, poseen una **actividad marcapaso**, por lo que se generan ondas lentas de despolarización y eventualmente descarga de potenciales de acción en forma de espiga, en los que participa una fracción de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. El potencial de acción (PA) suele propagarse a áreas vecinas, provocando la contracción de millones de células en forma sincrónica (sincicio). El PA generado principalmente por el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  puede activar a las proteínas contráctiles directamente, o estimular la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares, si el respectivo ML los tiene. El proceso en el que el desarrollo de la contracción depende de la despolarización de la membrana se conoce como **acoplamiento electromecánico**.

Arterias como la pulmonar y la carótida no descargan PA, sino que muestran una despolarización gradual de la membrana en respuesta a la interacción de **agonistas** con receptores acoplados a una proteína de tipo Gq, que por una cascada intracelular de transducción origina el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de tipo L. La cascada de segundos mensajeros intracelulares disparada por el receptor se inicia con la activación de una proteína Gq acoplada al receptor que cataliza la hidrólisis de GTP y la activación de la fosfolipasa C (PLC). Esta cataliza la conversión de los fosfatidilinositoles de membrana (PIP<sub>2</sub>) en inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). Este último activa a una proteína-quinasa C (PKC) encargada de fosforilar y activar a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En esas arterias el cambio del Em está dissociado de la contracción, mientras otras arterias como la aorta de conejo no presentan ningún cambio en el potencial de membrana cuando desarrollan tensión. Se denomina **acoplamiento fármaco-mecánico** al proceso en el que la contracción no depende del potencial de membrana, sino que es disparada por un agonista o neurotransmisor.

## Fuentes de calcio para la contracción del músculo liso

En el músculo liso la  $[\text{Ca}]_i$  es crítica para el desarrollo y mantenimiento de la fuerza, y es uno de los determinantes del tono visceral, por ej. del músculo liso gastrointestinal, uterino, traqueal, y urinario. **En reposo** la  $[\text{Ca}]_i$  es de alrededor de 0,1  $\mu\text{M}$  y la del medio extracelular de aproximadamente 1 mM. Dado que el potencial del lado interno de la membrana es negativo respecto al exterior (Em varía entre aproximadamente -40 y -60 mV dependiendo del tipo de

músculo liso) existe un gradiente electroquímico para el  $\text{Ca}^{2+}$  de alrededor de 185 mV. Esto favorece el influjo cuando se activan los canales iónicos con afinidad y selectividad por  $\text{Ca}^{2+}$ . Aunque en reposo las membranas celulares son poco permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , el ión difunde a través de canales de reposo llamados de "leak" a favor de su gradiente. El ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  por esta vía es muy bajo y no genera contracción, debido a que los mecanismos de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma tienen una alta afinidad y velocidad para removerlo, y logran mantener la baja  $[\text{Ca}]_i$ . En los músculos lisos que tienen alguna actividad espontánea tipo marcapaso se originan corrientes despolarizantes que activan un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  aun en ausencia del agonista, generando un tono basal peristáltico característico de cada víscera, por ejemplo en intestino, útero y vejiga.

**Ante la llegada del estímulo**, ya sea producido por la acción de transmisores químicos o por estiramiento de la fibra, se produce una despolarización o fosforilación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que los activa, permitiendo el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana al citoplasma, impulsado por el gradiente electroquímico. Básicamente la contracción se desencadena por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los **canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L**. El influjo a través de los canales supera inicialmente a la tasa de remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  por los diversos transportadores de eflujo, por lo que la  $[\text{Ca}]_i$  se eleva hasta 10  $\mu\text{M}$ . Esto genera una contracción mantenida mientras dure el estímulo. Si éste es un pulso breve eléctrico o un potencial espiga se produce una contracción transitoria seguida de relajación (**contracción en espiga o fásica**), pero si es prolongado por permanencia del agonista o de la despolarización se produce una contractura estable y duradera, denominada **tónica**. La enorme variabilidad que existe entre los diferentes músculos lisos hace difícil sacar conclusiones generales acerca de los mecanismos que regulan la duración y frecuencia de episodios de influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L se activan por distintos mecanismos como cambios en el potencial de membrana (por lo cual antes se los denominaba "canales operados por voltaje" o VOC) o acción de agonistas (antes denominados "canales operados por receptor" o ROC). No existen diferencias estructurales o eléctricas entre los canales L activados por voltaje o por receptor. El umbral de activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ocurre aproximadamente a -30 o -40 mV y se inactivan en aproximadamente 50 mseg. A diferencia del músculo cardíaco, en el liso la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular representa la mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  activador de la contracción, y muchos músculos lisos carecen de depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares o retículo endoplásmico (RE) (ej. intestino). Algunos músculos lisos, como los de arterias especialmente la aorta, desencadenan un mecanismo donde la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los ROC es amplificada por un proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ -inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE. Para disparar esta fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  los músculos lisos utilizan el mecanismo dependiente de agonista que produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por acción del segundo mensajero  $\text{IP}_3$ . En ese caso, el agonista promueve la activación de **dos tipos de canales presentes en el RE, los sensibles a  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) y los sensibles a Ryanodina ( $\text{RyR}$ )**, que además pueden cooperar entre sí. La secuencia de activación de este mecanismo se inicia al unirse el agonista a su receptor, este se acopla a la PLC a través de una proteína Gq, esto promueve la escisión de fosfatidilinositol ( $\text{PIP}_2$ ) en  $\text{IP}_3$  y DAG. A

diferencia del músculo liso visceral, en algunos vasos como la aorta, el reservorio del RE es relativamente grande, y el  $IP_3$  activa los canales de liberación de  $Ca^{2+}$  del RE contribuyendo a aumentar la  $[Ca^{2+}]_i$  junto al influjo por canales promovido por la vía del DAG/PKC. El tamaño de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  es variable en los distintos ML. Así, las aortas poseen grandes depósitos de  $Ca^{2+}$ , las arterias caudal y mesentéricas depósitos menos desarrollados, y las arteriolas de resistencia y el ML visceral no poseen depósitos (Bolton, 2006).

Al igual que en el músculo cardíaco, en condiciones de reposo o no estimulación los músculos lisos liberan pequeñas cantidades de  $Ca^{2+}$  desde el RE ("**sparks**") subumbrales para generar contracción. Estos pueden aumentar en frecuencia e intensidad cuando se administran fármacos estimulantes como cafeína o agonistas (noradrenalina, acetilcolina, histamina u otros). Además, el estiramiento de algunos ML, especialmente de las vísceras, genera tensión o fuerza debido al ingreso de  $Ca^{2+}$ , por lo que se sugirió la existencia de un grupo de **canales de  $Ca^{2+}$  activados por estiramiento** (SOC) (Karaki y Wiess, 1983).

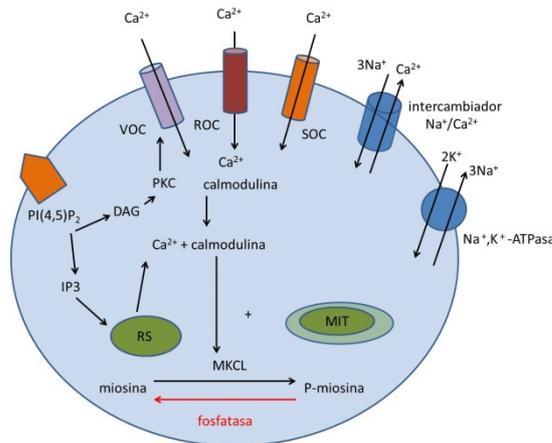


Figura 1. Influjos de  $Ca^{2+}$  por diferentes canales: canales L operados por voltaje (VOC), canales L operados por receptor (ROC), y canales activados por estiramiento (SOC). Se muestra también la vía disparada por el receptor acoplado a proteína Gq que provoca liberación de depósitos intracelulares por acción del segundo mensajero  $IP_3$ , y activación de canales L por el DAG/PKC, con el consiguiente aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

## Mecanismos de extrusión de calcio

La relajación del ML se produce principalmente cuando la  $[Ca]_i$  desciende a los niveles de reposo. Al cesar el estímulo que provocó el ingreso de  $Ca^{2+}$  predominan los mecanismos que lo remueven:

- las Ca-ATPasas de sarcolema (bombas de calcio sarcolemales),
- las Ca-ATPasas del retículo endoplásmico (RE) conocidas como SERCA
- el intercambiador Na/Ca sarcolemal (NCX)

Las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ca-ATPasas) poseen alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{0.5}$  de alrededor de 1  $\mu\text{M}$ ), se saturan con baja  $[\text{Ca}^{2+}]$ , funcionan continuamente, y son estimuladas por fosforilación de quinasas dependientes del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (CaMK). El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) es similar al de músculo cardíaco, y es un transporte activo secundario, que funciona generalmente ingresando 3  $\text{Na}^+$  a favor del gradiente para promover el eflujo de 1  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de su gradiente. Este movimiento de cargas lo hace electrogénico e influenciado por el potencial de membrana. Su funcionamiento está acoplado al de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa que mantiene un alto gradiente de  $\text{Na}^+$ . Este intercambiador está impulsado por el gradiente electroquímico, es decir por la combinación de gradientes iónicos y gradiente eléctrico, que determinan su potencial de reversa ( $E_{\text{NCX}} = 2 E_{\text{Ca}} - 3 E_{\text{Na}}$ ). Dado que los músculos lisos tienen potenciales de reposo ( $E_m$  de -50 a -20 aproximadamente) menores que el cardíaco ( $E_m$  cercano a -80 mV), en el ML es más probable que el NCX pueda funcionar en ambos modos, de eflujo de Ca (“forward”) o en sentido “reverso” promoviendo el ingreso de  $\text{Ca}^+$ . Eso ocurriría cuando el  $E_m$  sea menos negativo que el potencial de reversa del NCX ( $E_{\text{NCX}}$ ). Algunas condiciones como el frío, o patologías como la hipertensión parecen promover el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  por esta vía del NCX.

## Regulación autonómica del músculo liso visceral y mecanismos de agonistas

Según el tipo de músculo liso, hay diversos receptores y agonistas que generan o regulan la contracción, y acceden al mismo mediante inervación o el plasma. El músculo liso visceral gastrointestinal, el de bronquios y el detrusor de vejiga están regulados principalmente por el sistema nervioso autónomo parasimpático, el cual estimula su peristaltismo en cuanto a tono y frecuencia de espigas contráctiles, dependiendo del tipo de tejido. Por lo tanto la acción de **acetilcolina** (ACh) en los receptores colinérgicos de tipo muscarínico y subtipos M1 y M3 son los predominantes disparadores de la contracción. En muchos de los músculos lisos viscerales como los del aparato gastrointestinal, el detrusor de la vejiga y útero también hay receptores para la **serotonina** (5-HT). Por otra parte, en los músculos lisos de las vías genitourinarias como el conducto deferente y la uretra y uréteres, y en el trigono de la vejiga hay receptores  $\alpha$ -adrenérgicos para la **noradrenalina** (NA) liberada de las neuronas del sistema nervioso autónomo simpático (Goodman y Gilman, 2014).

Todos esos receptores tienen en común el acoplamiento con la proteína Gq que, como se explicó anteriormente, cataliza la hidrólisis de GTP y la activación de la vía de PLC/  $\text{PIP}_2$  /  $\text{IP}_3$  y DAG. El rol del  $\text{IP}_3$  es bajo en los músculos lisos viscerales, dado que poseen un escaso reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico (RE) que posee canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  activables por  $\text{IP}_3$  (Karakı y Wiess, 1983). En cambio, el DAG ejerce un rol mayor al estimular la PKC, que a su vez cataliza la fosforilación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Esto provoca el aumento en la frecuencia de activación de estos canales, y el masivo influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol formando una corriente que logra elevar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , activar a la calmodulina y disparar la con-

tracción, o aumentar la frecuencia y amplitud de las espigas del tono basal contráctil si el tejido tiene alguna actividad espontánea de tipo marcapaso (ejemplo: intestino, útero).

Por otra parte, las proteínas contráctiles del ML son reguladas por los niveles de los nucleótidos cíclicos, lo cual representa un sitio de acción de **agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos** o fármacos que aumentan los **niveles de AMPc**, como se describirá más adelante. Un aumento del AMPc citosólico activará a una proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), que cataliza la fosforilación de la quinasa de la cadena liviana de miosina (KCLM-P). La KCLM-P tiene baja afinidad por el complejo Ca-calmodulina, lo cual favorece la relajación por predominio de la actividad de las fosfatasa (que defosforilan a la CLM). Este efecto puede ser desencadenado por la activación del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico por las catecolaminas **adrenalina** e **isoproterenol**, ya que este receptor se encuentra acoplado a una proteína Gs, la cual por hidrólisis de GTP se enlaza y activa a la enzima efectora adenilato ciclasa (AC). La AC cataliza la formación de AMPc a partir de ATP, y desde allí se retoma la cascada descrita que conduce a relajación. Otro modo de elevar los niveles de AMPc y relajar el músculo liso es por la **inhibición de la actividad de la enzima fosfodiesterasa (PDE)** que cataliza la degradación del AMPc a 5'-AMP. Este mecanismo es llevado a cabo por fármacos como la **papaverina**, las metilxantinas **teofilina** y **cafeína**, y fármacos más nuevos como el **sildenafil**, la **milrinona** y la **amrinona**.

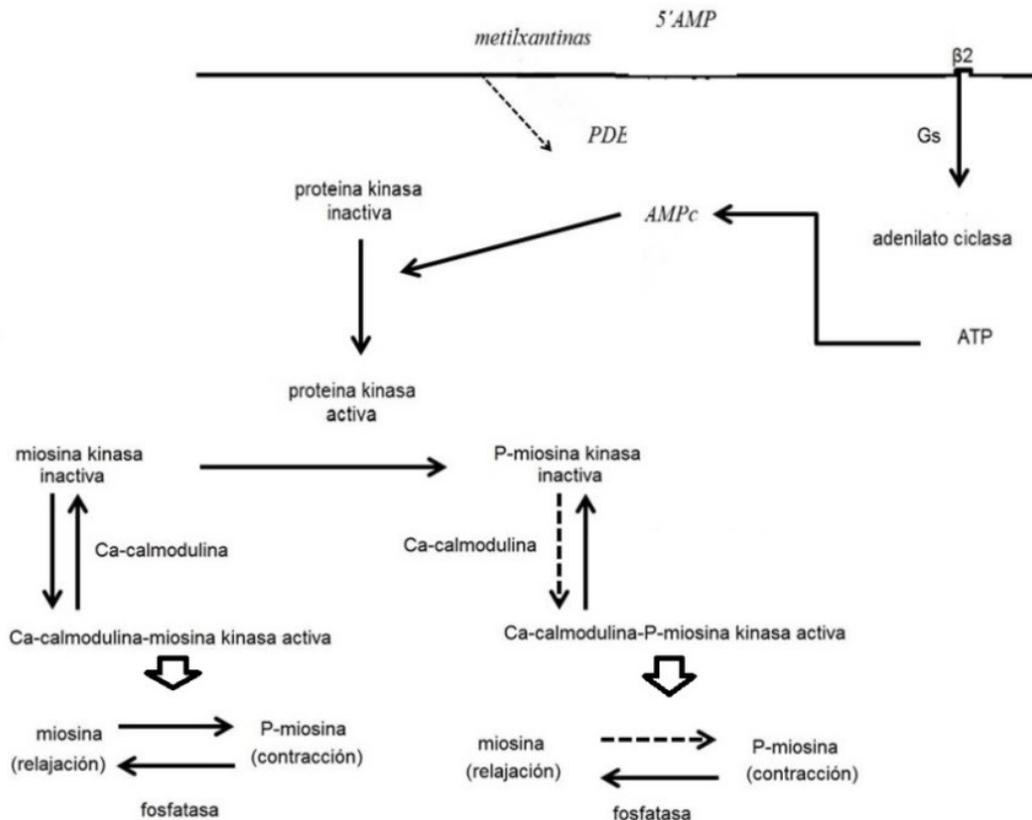


Figura 2. Regulación de la contracción por diferentes drogas que aumentan el nivel de AMPc.

# Mecanismos de fármacos o intervenciones *in vitro*

## 1 - Despolarización por alta $[K^+]_e$ :

Al aumentar la  $[K^+]_e$  se produce una disminución del gradiente de  $K^+$  y, debido a que la membrana tiene una relativamente alta permeabilidad al  $K^+$  mediada por la activación de varios tipos de canales de  $K^+$ , habrá una despolarización del músculo. Los canales de  $K^+$  más abundantes en el ML son los dependientes del voltaje ( $K_v$ ), los dependientes del Ca y voltaje de gran conductancia ( $BK$ ), y los dependientes de la reducción del nivel de ATP ( $KATP$ ). Dependiendo del ML predominarán unos u otros, según se describirá más adelante.

La reducción del gradiente de  $K^+$  genera una disminución del potencial de membrana ( $E_m$ ) desde -60 mV a -40 mV u otro valor que depende de la  $[K^+]_e$  utilizada (a más de 10 mM  $K^+$ ) y tiende al  $E_K$  (potencial de equilibrio o de Nerst). Esta despolarización activa a los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, lo cual aumenta el influjo de  $Ca^{2+}$  y conduce a la contracción del músculo liso. El proceso de la contracción depende exclusivamente de la existencia de  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular y es totalmente sensible a los bloqueantes del canal de  $Ca^{2+}$  (nifedipina, verapamil, diltiazem, etc.).

## 2- Agonistas $\alpha$ -adrenérgicos

En arterias, en el conducto deferente y en los ML del sistema genitourinario como trigono, uretra y uréteres, los agonistas que actúan sobre **el receptor  $\alpha_1$  adrenérgico** (**NA, fenilefrina, metoxamina, adrenalina**) inducen, en presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, un aumento en la  $[Ca]_i$ . El mecanismo de transducción del receptor implica la activación de una proteína Gq acoplado a la ya explicada vía de PLC/ segundos mensajeros  $IP_3$  y DAG/ PKC que fosforila y activa a los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. Cuando se trabaja con los tejidos aislados, en ausencia de  $Ca^{2+}$  en el medio nutritivo (solución Tyrode, Krebs, de Jalon, según el tejido) se reduce abruptamente la contractilidad. En algunos ML que tienen un importante reservorio de  $Ca^{2+}$  en el RE, como la aorta, en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, los agonistas  $\alpha_1$  solo producen transitorios aumentos en la  $[Ca]_i$  y en el tono (contracción fásica), mientras que se reduce abruptamente la contracción estacionaria (tónica). La fase tónica depende del influjo de  $Ca^{2+}$  a través de canales L de  $Ca^{2+}$  mientras la contracción fásica o transitoria se ha asociado a la liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares, mediante la activación de canales del RE sensibles al  $IP_3$ . Por acción de antagonistas o bloqueantes del canal de  $Ca^{2+}$  como verapamil y dihidropiridinas, la contracción fásica es poco afectada mientras la tónica se elimina, ya sea en el ML de vasos sanguíneos como en los ML viscerales.

En algunos ML, especialmente los de arteriolas y venas como la portal, existe el **receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico**, que al ser estimulado por agonistas como NA, activa directamente a un canal de  $Ca^{2+}$  tipo L asociado a dicho receptor, pero no libera  $Ca^{2+}$  de depósitos intracelulares. Por

ello, la contracción es totalmente sensible a los bloqueantes cálcicos o a la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio. Es importante recordar que también hay receptores  **$\alpha_2$ -adrenérgicos presinápticos** en las neuronas noradrenérgicas de todo el organismo y en las colinérgicas que inervan a las vísceras. Ese receptor está acoplado a una proteína  $G_i$  que por hidrólisis se disocia en la subunidad  $G_{i\alpha}$  que inhibe a la adenilato ciclasa (AC) y la  $G_{i\beta\gamma}$  que activa a canales de  $\text{K}^+$ . Este mecanismo conduce a hiperpolarización de las terminales axónicas, y por lo tanto a menor activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual desencadena una disminución de la exocitosis.

Por otra parte, el efecto de los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos puede ser selectivamente inhibido por **antagonistas** de dichos receptores. El más antiguo, **fentolamina** es un antagonista no selectivo de los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ -adrenérgico. Luego se sintetizaron antagonistas selectivos  $\alpha_1$ -adrenérgicos como **prazosina**, **terazosina** y **doxazosina**, que se emplearon inicialmente como hipotensores y más tarde como agentes para el tratamiento de la hipertrofia prostática benigna. Por otra parte, de una planta medicinal ancestral (*Rawolfia serpentina*, de la que también se obtiene la reserpina) se extrajo un antagonista selectivo  $\alpha_2$ -adrenérgico: la **yohimbina**.

### 3- Agonistas colinérgicos

La **acetilcolina** (ACh), y sus análogos sintéticos como el **carbacol**, la **metacolina** o el **betanecol** son agonistas muscarínicos que desencadenan la contracción de las vísceras y/o el aumento de las secreciones porque estimulan a los receptores  $M_3$  y  $M_1$  en el músculo liso. Estos receptores están acoplados a una proteína  $G_q$  y a la vía de la PLC/DAG e  $\text{IP}_3$  que por activación de la PKC fosforila y activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Además, en músculos con actividad eléctrica propia (ej. tracto gastrointestinal, útero, vejiga) se produce despolarización por el agonista y consecuente activación de los mismos canales dependiente del voltaje. En esos músculos lisos viscerales no hay indicios de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular vía  $\text{IP}_3$  por el receptor  $M_3$ .

Otros músculos lisos como los participantes en esfínteres poseen receptores  $M_2$  y  $M_4$  que están acoplados a una proteína  $G_i$ . Al igual que lo explicado en las terminales axónicas, al hidrolizar GTP, la proteína  $G_i$  se disocia en una subunidad  $\alpha$  y otra subunidad  $\beta\gamma$ . La primera inhibe a la adenilatociclasa (AC) reduciendo el nivel de AMPc, mientras la segunda activa directamente a los canales de  $\text{K}^+$ . El resultado es que se hiperpolariza la fibra de ML y con ello se relaja. Así en el tracto gastrointestinal la acción coordinada de ACh en los diversos receptores produce la contracción del músculo circular y longitudinal de grandes sectores y la relajación de otras zonas de esfínter promoviendo el avance del contenido (ondas peristálticas).

Entre los antagonistas muscarínicos están los alcaloides del tropano obtenidos de la planta *Atropa belladonna* **atropina** y **escopolamina** (no selectivos para todos los receptores M) que también llegan al SNC, y otro alcaloide del *Hiosciamus niger* (hiosciamina). Otros derivados sintéticos de amonio cuaternario no llegan al SNC y por lo tanto tienen menos efectos adversos y se usan como antiespasmódicos viscerales (**hioscina** y **homatropina**). Más recientemente se sintetizaron 2 antagonistas con acción más selectiva en el detrusor de la vejiga que en el intes-

tino: **oxibutinina** y **tolterodina**. Existen otros antagonistas con acción selectiva en M1 (**pirenzepina**, con una baja actividad como antiácido estomacal dado que los receptores M1 están en las células parietales y ganglios colinérgicos del estómago). Para relajar al ML del músculo circular del ojo se emplean antimuscarínicos tópicos como son **tropicamida** y **ciclopentolato** en colirios, con lo cual se induce la midriasis necesaria para realizar un fondo de ojo- Sin uso terapéutico existen antagonistas selectivos por receptores M2 (metoctramina) y M3 (4-DAMP) que se emplean experimentalmente para identificar al receptor en estudios farmacodinámicos de tejidos aislados.

#### 4- Endotelina-1

Actúa sobre receptores  $ET_A$  y produce contracción sostenida con aumento de la  $[Ca]_i$  en tejidos como aorta, tráquea, útero, arterias carótida y mesentérica. Sin embargo, ejerce un muy escaso efecto sobre íleon, intestino y vaso deferente. En estos tejidos, la contracción está asociada a la liberación de  $Ca^{2+}$  vía  $IP_3$  en el inicio fásico y a la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L en la fase tónica. Sin embargo, en el útero la activación del receptor  $ET_A$  no produce liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular, sino solo influjo de  $Ca^{2+}$  por canales L. Además, la endotelina actúa sobre receptores  $ET_B$  en la vena pulmonar, arteria coronaria y tráquea, que también están acoplados solo al influjo de  $Ca^{2+}$  por canales L.

#### 5- Prostaglandinas

Las prostaglandinas (PG) son de diversos tipos y actúan en diversas clases de receptores: Algunos de estos receptores inducen efectos relajantes del ML:

- los receptores  $EP_2$  y  $EP_4$  que se activan por la  $PGE_2$  y están acoplados a la vía Gs/AC/AMPC
- los receptores IP que se activan por la prostaciclina ( $PGI_2$ ) y se acoplan a la misma vía de Gs

Otros receptores generan estimulación pero están en varios tejidos, no sólo el ML:

- los receptores  $EP_1$  se activan por la  $PGE_2$  y están acoplados a la vía Gq/PLC/PKC
- los receptores FP A y B se activan por la  $PGF_{2\alpha}$  y está también acoplada a la vía Gq/PLC/PKC

Como en otros casos, los productos de la PLC inducen liberación transitoria de  $Ca^{2+}$  intracelular vía  $IP_3$  en algunos músculos (por ej. bronquios y aorta). Pero la respuesta más importante es una activación mantenida del influjo de  $Ca^{2+}$  por canales L acoplado a contracción durante la fase tónica (ej. en aorta y bronquios). En tejidos como los bronquios, las PG también inducen aumento de las secreciones, mediante el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Los productos obtenidos a partir del ácido araquidónico por catálisis de la ciclooxigenasa (PG) o de la lipooxigenasa (LT,

leucotrienos) son los mediadores que generan broncoespasmo y aumento de las secreciones en un bronquio hiperactivo o asmático.

## 6- ATP

Produce una liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activada por el receptor purinérgico  $\text{P}_{2Y}$  que se acopla a la liberación de  $\text{IP}_3$ , seguido por un aumento sostenido del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  por canales L activados por los receptores  $\text{P}_{2X}$  y  $\text{P}_{2Y}$ , en vena portal, vaso deferente y aorta.

## 7- Angiotensina II

Actuando en el receptor  $\text{AT}_1$  acoplado a la vía  $\text{Gq/PLC/IP}_3$  y  $\text{DAG}$  estimula a ambos componentes: la liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (mediada por la formación de  $\text{IP}_3$ ) y la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L por la  $\text{PKC}$ .

# Mecanismos de fármacos relajantes del músculo liso

## 1- Bloqueantes cálcicos

Son selectivos inhibidores del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Se dividen en dos grupos:

**a-Dihidropiridinas** (nifedipina, nitrendipina, amlodipina, nicardipina, etc.): se unen al canal desde el exterior bloqueando en forma competitiva el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Son más selectivos por el músculo liso que por el cardíaco. Producen una significativa vasodilatación (hipotensión) y disminución del tránsito gastrointestinal.

**b- Verapamil y diltiazem:** ingresan a la célula a través de la membrana bilipídica por su lipofilia, y se unen al canal desde el interior celular, preferentemente en el estado inactivado, dando un bloqueo dependiente del voltaje (es decir de la frecuencia de estimulación o del grado de despolarización). Son más selectivos por el músculo cardíaco (dando bradicardia) pero también relajan al músculo liso vascular (hipotensión) o de otras vísceras.

En todos los casos, cuando se reduce el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales L comienzan a predominar los mecanismos de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas e intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) desencadenando la disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y en consecuencia la relajación del tono basal o de la contracción. Ambas clases de bloqueantes cálcicos son capaces de relajar la contractura tónica, pero afectan muy escasamente a la fásica cuando esta se debe a liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE.

## 2- Abridores de los canales de K<sup>+</sup>

Estos agentes (como **diazóxido**, **minoxidil**, **nicorandil**, **pinacidil**, **cromakalim**, **adenosina**, **prostaciclina**) activan a los canales de K<sup>+</sup> (Kv, KATP, BK) permitiendo el eflujo de K<sup>+</sup> de la célula, lo cual la hiperpolariza. En consecuencia, se requiere un estímulo despolarizante mayor para alcanzar el umbral para la activación de los canales de Ca<sup>2+</sup>, por lo que para el mismo estímulo se reduce la corriente I<sub>Ca</sub>. En consecuencia, ocurre la relajación del tono basal muscular (si el músculo liso lo tiene) o de la contractura tónica debida a agonistas. Además, la hiperpolarización reduce la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RS inducida por IP<sub>3</sub>.

Ese efecto es antagonizado por inhibidores del canal de K<sup>+</sup> sensible a ATP (KATP) como **glibenclamida** y **gliburida**, o de los canales de K-dependientes de voltaje (Kv) como tetraetilamonio (**TEA**) que puede inhibir a todos los canales de K<sup>+</sup>.

## 3- Agonistas β<sub>2</sub>-adrenérgicos

En algunos músculos lisos (como arteriolas, tracto gastrointestinal, tráquea, vejiga, útero) está presente el receptor β<sub>2</sub>-adrenérgico por el cual son afines adrenalina y otros agonistas más selectivos como **salbutamol** y derivados broncodilatadores, **isoproterenol** y **ritodrina** e **isoxuprina** que relajan el ML uterino. Este receptor está acoplado a una proteína Gs que activa a la AC, con la consecuente producción de AMPc, activación de PKA, fosforilación de la KCLM y relajación por el predominio de la acción de fosfatasa sobre la CLM.

## 4- Participación del óxido nítrico (NO)

El endotelio de los vasos sanguíneos es una fuente del antiguamente denominado "factor relajante de endotelio" (FRDE) e identificado posteriormente como óxido nítrico (NO) (Figura 3). Esta molécula gaseosa es sintetizada a partir de L-Arg y O<sub>2</sub> en el endotelio vascular, en respuesta a la unión de ciertos agonistas en sus receptores endoteliales (por ej. Ach en M<sub>1</sub> o histamina en H<sub>1</sub>). Luego el NO difunde fácilmente hacia la capa de músculo liso vascular vecina y estimula la vasodilatación por unirse al grupo de Fe<sup>2+</sup> hemo de la guanilato-ciclasa (GC), que cataliza la formación de GMPc. Finalmente, ya sea mediante la vía PKG (dependiente de GMPc) o directamente, se producen variados efectos como:

- a- activación de canales de K<sup>+</sup> con la consiguiente hiperpolarización
- b- inhibición de la formación de IP<sub>3</sub> debida a la hiperpolarización
- c- estimulación del eflujo de Ca<sup>2+</sup> vía intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> y bomba de Ca<sup>2+</sup> del sarcolema
- d- estimulación de la actividad fosfatasa de la cadena liviana de miosina (CLM)
- e- inhibición del influjo de Ca<sup>2+</sup> por canales L debido a la hiperpolarización o a la PKG
- f- inhibición de la fosfodiesterasa PDE II, que provoca aumento del AMPc, y subsecuente activación de la PKA (ésta estimula a la I<sub>K</sub> y a la fosfatasa de la CLM).

Todos estos efectos conducen a relajación del músculo liso vascular. El principal estímulo fisiológico para liberar NO es el stress de pared del vaso y fundamentalmente una señal vasoconstrictora que aumente el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el endotelio. Eventualmente puede formarse NO en algún otro músculo liso, como el gastrointestinal, lo cual conduce también a relajación. En ese caso, el NO se forma como neurotransmisor en algunas neuronas del circuito mientérico (ver figura 4).

La síntesis de NO depende de la presencia de NADPH, FAD, FMN, tetrahidrobiopterina y calmodulina como cofactores, y de la enzima NO-sintasa (NOS). Existen 3 clases de NOS:

- a) en células endoteliales: NOS activable por  $\text{Ca}^{2+}$
- b) en células neuronales no-adrenérgicas no-colinérgicas (NA-NC), y en músculo esquelético
- c) NOS inducible por endotoxinas bacterianas y citoquinas inflamatorias en macrófagos, en corazón y en músculo liso, que es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La NO sintasa puede ser inhibida por *antagonistas selectivos como L-NAME y L-NMMA*.

Existen fármacos que son **activadores de la producción de NO** con uso terapéutico como vasodilatadores. Por ej. los nitratos orgánicos como la nitroglicerina o el nitrato de isosorbide son útiles en coronariopatías o prevención de un segundo episodio de infarto. La hidralazina o el nitroprusiato de sodio son útiles como potentes hipotensores por su acción sistémica.

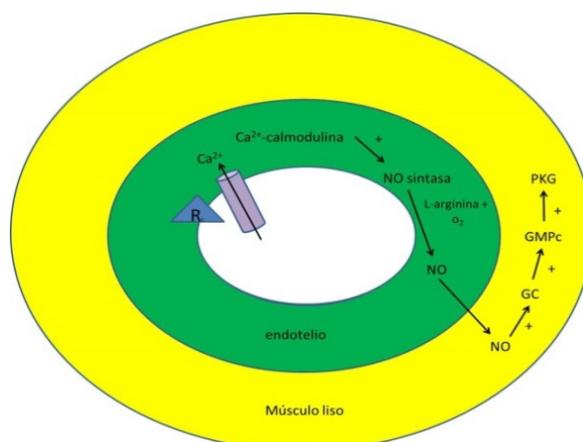


Figura 3. Secuencia de eventos iniciada por un receptor de tipo M1 o H1 en el endotelio de vasos que desencadena el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula endotelial, y la activación de la NO sintasa. Este mecanismo de síntesis también puede ocurrir en una neurona entérica. La difusión del NO hacia el músculo liso vecino activa una cascada de transducción celular que conduce a la vasodilatación (ver el texto para detalles)

## Músculo liso gastrointestinal

El músculo liso intestinal es innervado tanto por las ramas simpáticas como por las ramas parasimpáticas del sistema nervioso autónomo. Las fibras parasimpáticas hacen sinapsis en dos sitios ganglionares, en el plexo mientérico (Auerbach) y en el plexo submucoso (Meissner). En el plexo mientérico se encuentra una capa muscular circular y una longitudinal, las fibras longitudinales están presentes en la superficie externa del intestino. En la mayoría de los experimentos que utilizan este preparado se evalúa la acción de drogas sobre la fuerza de contrac-

ción de la capa muscular longitudinal, porque el preparado se cuelga en esa dirección, manteniendo el tubo intestinal abierto para la circulación del medio oxigenado. Las fibras simpáticas también inervan el intestino, fundamentalmente por terminales noradrenérgicas que llegan a los plexos. La NA liberada puede actuar en receptores alfa-2 ( $\alpha_2$ ) ubicados presinápticamente en las terminales colinérgicas, por lo cual inhibe la liberación de acetilcolina. De esta manera ejerce los efectos opuestos al parasimpático en el peristaltismo.

Los movimientos peristálticos son miogénicos y principalmente accionados por reflejos locales. El movimiento pendular es el único que perdura en el intestino una vez aislado, y se debe a una actividad eléctrica marcapaso con localización oscilante en el músculo, que genera pulsos de despolarización. Estas ondas, comúnmente conocidas como espigas, activan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L que desencadenan el tono basal y contracciones pendulares. Esto se comprueba porque la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular disminuye el tono y el movimiento pendular.

La actividad eléctrica rítmica es una característica de la mayoría de los músculos lisos, pero las consecuencias mecánicas pueden variar desde las contracciones fásicas rápidas y regulares a la contractura sostenida. Por muchos años se pensaba que la actividad eléctrica espontánea se originaba en las células del músculo liso, pero recientemente se encontró que hay **células marcapaso especializadas** en muchos órganos que son morfológica y funcionalmente distintos del músculo liso y son la fuente de la actividad eléctrica espontánea. Tal función marcapaso está bien documentada para las **células intersticiales de Cajal (CIC)** del tracto gastrointestinal, pero hay evidencias de células tipo CIC que juegan un rol similar en otros tipos de músculo liso (como uretra, vejiga y útero). En intestino están adheridas por debajo de la capa del músculo liso longitudinal. Recientes resultados sugieren que las oscilaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]$  en células intersticiales uretrales de conejo aislado son iniciadas por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares sensibles a ryanodina, que la frecuencia de oscilación es muy sensible a la concentración externa de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que la conversión de la oscilación primaria a las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  propagadas dependen de la liberación de calcio inducida por  $\text{IP}_3$  (Mc Hale y col., 2006).

### **Sistema nervioso entérico**

Posee autonomía e incluye circuitos neuronales que regulan la contractilidad, secreciones, transporte de sustancias, flujo sanguíneo, y modula funciones endócrinas e inmunológicas. Está formado por neuronas integradas en ganglios entéricos conectados entre sí y localizados mayormente en el plexo mientérico (ME), con algunas aferentes primarias llegando al plexo submucoso (SM).

**Neuronas aferentes primarias (NAP):** responden a estímulos químicos y mecánicos luminales de la mucosa y a la distensión muscular. Reciben sinapsis de otras neuronas aferentes por medio de los neurotransmisores (NT) como la sustancia P que actúa en sus receptores de cininas (**NK**), y serotonina (5HT) que actúa en receptores de tipo **5HT4**. Cuando se produce estimulación del 5HT4, las NAP producen la liberación de otros NT como el “péptido activador de la calcitonina” (**CGRP**) que actúa sobre interneuronas generalmente colinérgicas.

**Interneuronas ascendentes y descendentes (IN):** las IN ascendentes (INA) conectan sus axones en sentido oral a motoneuronas excitadoras circulares mediante sinapsis colinérgicas nicotínicas (receptores **N<sub>g</sub>** constituidos por un canal de Na<sup>+</sup>) y no colinérgicas (neurocininas en receptor **NK**), y reciben sinapsis de otra INA, formando una red excitadora ascendente que lleva la información al sistema nervioso central (SNC). Las IN descendentes (IND) reciben estímulos de neuronas aferentes no primarias y hacen sinapsis en sentido caudal hacia otras neuronas mientéricas y submucosas. Algunas tienen NT excitatorios (Ach en receptores **M1** y **M3** y 5-HT en receptores **5-HT4**). Otras IND producen NT inhibitorios como óxido nítrico (**NO**) y péptido intestinal vasoactivo (**VIP**) hacia neuronas mientéricas y submucosas, ejerciendo el control motor, secretor y vasomotor.

**Motoneuronas excitatorias (ME):** son el paso final para la activación motora del ML en la capa mientérica circular y longitudinal. Producen Ach y 5-HT como NT y hacen sinapsis en el músculo liso o en las CIC.

**Motoneuronas inhibitorias (MI):** hacen sinapsis sobre la capa de ML circular, directa o indirectamente a través de las CIC, y producen como NT a NO, ATP y VIP.

**Neuronas secretomotoras y vasomotoras (NS y NV):** se originan en ambos plexos ME y SC, e inervan a la mucosa y a vasos sanguíneos mediante la producción de NT como Ach y VIP, algunos con conexión a ganglios mientéricos, conectando funcionalmente secreción y motilidad.

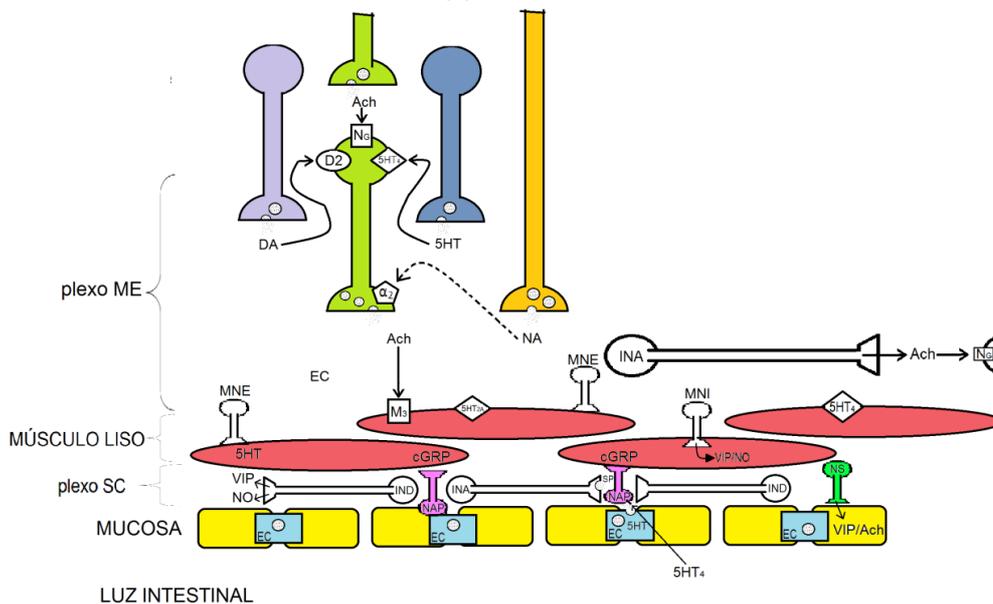


Figura 4. Esquema de las neuronas participantes en la neurotransmisión entérica: vías autonómicas (colinérgicas, noradrenérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas) llegan al plexo mientérico (ME) para regular el peristaltismo mediante su interacción con las últimas neuronas efectoras sobre el músculo liso, que son las motoneuronas excitatorias (MNE) e inhibitorias (MNI). La vía ascendente sensorial está representada por las neuronas aferentes primarias (NAP), las interneuronas ascendentes (INA) y descendentes (IND), las células enterocronafines (EC) y las neuronas secretomotoras (NS) que se integran en el plexo subcutáneo (SC) (ver el texto para detalles y neurotransmisores)

Hay diversos movimientos coordinados en esta red neuronal mientérica con control intrínseco y extrínseco. La actividad del *complejo motor migratorio* se inicia con la actividad espontánea en motoneuronas excitatorias sobre el músculo circular dando movimientos segmentarios, e incluye neuronas entéricas colinérgicas (receptores **Ng**) e interneuronas descendentes, dando un movimiento en sentido caudal. La *actividad miogénica* genera contracciones rítmicas del ML, y en ocasiones propulsivas. La *acomodación* en estómago y colon genera sinapsis inhibitorias descendentes y circunferenciales que se activan por distensión parietal. La *peristalsis* es el movimiento propulsivo que se activa por contracción de un segmento de músculo circular, que se propaga en sentido distal.

### **Contractilidad colónica**

La contractilidad colónica está controlada por procesos interactivos complejos en el intestino, involucrando tanto a células nerviosas (*neurogénico*) como la actividad espontánea muscular (*miogénico*).

Si se bloquea la peristalsis del colon de rata *in vitro* con antagonistas de la actividad neuronal entérica, como son los bloqueantes de los canales de Na<sup>+</sup> *tetrodotoxina (TTX) o lidocaina*, la adición de un agonista colinérgico induce una recuperación en las contracciones propagadas. A partir de estos datos se sugirió que *las redes de células intersticiales de Cajal (CIC) trabajan cooperativamente con el sistema nervioso entérico para crear los patrones motores colónicos*, y que los principales mecanismos propulsivos son el resultado de la actividad de las contracciones del músculo circular conducido por el marcapaso. En el colon canino y humano, las ondas lentas en el músculo circular con frecuencias en el rango de 3–9 por minuto se originan desde las CIC en el plexo submucoso. Además, hay oscilaciones de membrana más rápidas (oscilaciones del plexo mientérico), con frecuencias en el rango desde 15 a 30 por min, que se originan desde una red de CIC cercana al plexo mientérico.

Los complejos motores propagados ocurren espontáneamente en el colon aislado y pueden también ser disparados por estimulación local (distensión o lesión de la mucosa). Estos complejos son generados por el disparo sincronizado de poblaciones de interneuronas mientéricas ascendentes y descendentes que activan a las neuronas motoras excitatorias en una forma coordinada. Los potenciales de unión excitatoria tienen una frecuencia de 1–2 Hz, y coinciden con la desinhibición de la capa de músculo circular. Por lo tanto, se requiere una ajustada coordinación temporal de transmisión neuroefectora inhibitoria y excitatoria. Cuando los complejos son abolidos por el bloqueo neural, la aplicación al medio del preparado de *carbacol* causa despolarización pero no evoca las oscilaciones de 2-Hz, confirmando que ellos probablemente requieren un disparo coordinado del circuito neural entérico (Costa y col., 2013).

### **Mecanismos de la regulación autonómica del peristaltismo intestinal**

La *estimulación parasimpática* aumenta la actividad peristáltica, mientras que la estimulación de los nervios simpáticos inhibe los movimientos peristálticos. La acción del sistema nervioso parasimpático es mediada vía receptores muscarínicos M<sub>3</sub>, que por acción de la

acetilcolina (ACh) aumentan el peristaltismo con movimientos segmentarios, de avance, de mezcla, etc.

La contracción del músculo liso intestinal está desencadenada por dos tipos de estímulos: **despolarización** por una actividad marcapaso conducida entre fibras a modo de sincicio (que activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L por voltaje), y acción de la ACh sobre su receptor **M<sub>3</sub>** que está acoplado a una proteína **Gq** y a la cascada PLC/DAG/PKC que fosforila y activa canales de Ca tipo L. Aún cuando varíe el modo de estimulación, por el receptor y por voltaje, los canales activados pertenecen al tipo L. Debido a que el músculo liso de duodeno carece de RS importante, no es significativo el mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vía  $\text{IP}_3$ . El registro contráctil también posee una respuesta transitoria fásica y una estable tónica, pero ambas son dependientes del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular por canales L, debiéndose aparentemente las diferencias a dos depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  externo con diferente accesibilidad al canal.

Los **efectos inhibitorios** son ejercidos por el sistema nervioso simpático, y están mediados por los **receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos**. Los receptores  $\beta$  son de tipo  **$\beta_2$** , activables por la adrenalina circulante en plasma. Median la relajación del músculo liso intestinal por activación de la vía Gs/AC/AMPc/PKA que fosforila a la KCLM reduciendo la contractilidad de las fibras musculares lisas. Los receptores  **$\alpha_1$**  son minoritarios y están localizados en zonas que funcionan como esfínteres en el tubo intestinal, y se acoplan a la vía Gq/PLC/DAG/PKC que conlleva contracción de fibras circulares que limitan el avance peristáltico. Se describen también algunos receptores  $\alpha$  acoplados a una Gi que desencadena hiperpolarización del ML gastrointestinal. Los receptores  **$\alpha_2$**  son más abundantes, y están localizados presinápticamente en las fibras parasimpáticas de los plexos mientéricos. Son activados por la noradrenalina (NA) liberada de las terminales axónicas simpáticas que llegan al mismo plexo, y activan una proteína Gi que se disocia en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\text{Gi}\alpha$  inhibe a la adenilatociclasa (AC) reduciendo el nivel de AMPc y consecuentemente de la PKA, mientras la subunidad  $\text{Gi}\beta\gamma$  activa directamente a los canales de  $\text{K}^+$ . El resultado es que se hiperpolariza la terminal axónica y se reduce el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  por canales, con la consecuencia de que se disminuye el proceso de exocitosis dependiente de Ca, y se reduce entonces la liberación de ACh, con lo cual se atenúa el peristaltismo (Figura 4).

### **Efectos intestinales de la serotonina**

La serotonina participa en la transducción sensorial mucosa y en el reflejo peristáltico. El 80-90% de la serotonina se encuentra en el tracto GI, y de la serotonina total corporal el 90% está producido y almacenado en las células enterocromafines (EC) y un 5-10% es neurotransmisor en las neuronas entéricas. Cuando la presión intraluminal se incrementa, las células EC liberan serotonina, la cual estimula a las fibras nerviosas aferentes vagales e intrínsecas (entéricas), iniciando el reflejo peristáltico.

La 5-HT es liberada de células EC y plaquetas, o de las neuronas entéricas por la conducción mediada por la activación sucesiva de canales de  $\text{Na}^+$  en el nervio. La 5-HT liberada actúa sobre varios tipos de receptores expresados en intestino, como **5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>** y

**5-HT7**, aunque el efecto se debe principalmente a su acción sobre receptores **5-HT4**. Los receptores 5-HT1 y 5-HT7 son inhibitorios por acoplarse a una proteína Gi y activar los canales de K<sup>+</sup> produciendo hiperpolarización. Los receptores 5-HT2, 5-HT3 y 5-HT4 son excitatorios. El receptor 5-HT4 dispara las respuestas motoras entéricas, ya que está ubicado en las neuronas aferentes primarias (NAP) y se acopla al mecanismo intracelular de Gq/PLC/DAG. La activación de receptores *presinápticos 5-HT4 ubicados en las neuronas colinérgicas estimula la liberación de Ach* por activación de la misma vía intracelular, y en consecuencia aumenta la contracción muscular intestinal (Figura 4). Los receptores 5-HT2A están ubicados en las fibras de músculo liso, en las que también hay receptores 5-HT4. Los receptores 5-HT3 están en la fibra post-sináptica de los ganglios intestinales.

Varias **enfermedades gastrointestinales** se relacionan con la serotonina (5-HT): el síndrome de intestino irritable, problemas con el reflejo peristáltico que generan constipación y diarrea. Y hay **fármacos** denominados en general **proquinéticos** que estimulan a los receptores 5-HT4 (cisaprida, cinitaprida) y con ello ejercen un efecto estimulante del vaciamiento gástrico y del tono del esfínter esofágico, reduciendo el riesgo de reflujo gastro-esofágico que es muy frecuente en recién nacidos y, en ocasiones, acompaña a la hiperacidez.

### **Cambios en el síndrome de colon irritable**

La 5-HT es el principal mediador involucrado en el síndrome de intestino irritable, y se propone que los cambios en su metabolismo podrían ser la causa de hipersensibilidad visceral. La situación gastrointestinal (GI) puede complicarse por lo siguiente: (a) en los efectos de serotonina están involucradas las motoneuronas entéricas intrínsecas excitatorias e inhibitorias; (b) la serotonina puede estimular a las *neuronas colinérgicas* para liberar acetilcolina, lo cual resulta en la contracción del músculo liso, o puede estimular *neuronas nitrérgicas inhibitorias* para liberar óxido nítrico, resultando en la relajación.

La serotonina participa en la transducción sensorial mucosa y en el reflejo peristáltico, liberándose de las células EC cuando la presión intraluminal se incrementa, y así estimula a las fibras nerviosas aferentes vagales e intrínsecas (entéricas), que inician el reflejo peristáltico. Se eleva en pacientes con síndrome de colon irritable (SCI) con síntomas predominantes de diarrea. En este caso, un antagonista del receptor 5-HT3 es un prometedor agente terapéutico, especialmente porque puede disminuir la nocicepción visceral. Algunos **setrones** (antagonistas del receptor 5-HT3 como **ondansetron**) lentifican el tránsito colónico y disminuyen el dolor abdominal y la frecuencia de defecación. Pero su acción principal es el bloqueo del receptor 5-HT3 en la zona quimiorreceptora gatillo que reduce la emesis. El agonista del receptor 5-HT4 **tegaserod** ha mejorado los síntomas de constipación del SCI. Por otra parte, los **inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS)** como fluoxetina, paroxetina y citalopram tuvieron efectos benéficos en el SCI.

Además de la serotonina, hay otros compuestos involucrados de manera aún desconocida, tales como: colecistoquinina, sustancia P, polipéptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), y otros.

La **colecistoquinina (CCK)** y la **gastrina** son neuropéptidos con acciones en el tracto GI y en el SNC. Actúan en dos tipos de receptores denominados **CCK1** y **CCK2**. Ambos están presentes en tracto GI y en algunas regiones del SNC. Los receptores CCK1 se encuentran en neuronas mientéricas y en el músculo liso longitudinal, y son parcialmente responsables del control de las funciones motoras y percepción del dolor. Están acoplados a la vía de la proteína Gq/11 que conduce a activación de la PLC, al aumento de la  $[Ca^{2+}]$  y la contracción. Además, altas concentraciones de agonista pueden activar la vía de Gs/AC/AMPc y PKA, que lleva a relajación. En pacientes de SCI la infusión de CCK ha acentuado el dolor, por lo cual se le atribuye un efecto pro-nociceptivo y de aumentada motilidad. En cambio, un antagonista CCK1 dexloxiglumida 200 mg/kg durante 12 semanas mejoró el dolor abdominal y el discomfort (de Carvalho Rocha y col., 2014).

### Otros receptores inhibitorios de la exocitosis colinérgica en intestino

Curiosamente, se han encontrado receptores presinápticos en las neuronas colinérgicas del plexo mientérico que responden a análogos endógenos de drogas que inicialmente se conocieron por su actividad en el SNC y su proveniencia de productos naturales. Se trata de receptores  **$\mu$ -opioides** y los receptores **CB1** y **CB2 cannabinoides**.

Los receptores  **$\mu$**  responden a las endorfinas y encefalinas endógenas, que son mediadores de analgesia central y reducen la exocitosis de Ach en el intestino, reduciendo el peristaltismo. Un análogo sintético de dichos receptores es la **loperamida**, que puede emplearse como antidiarreico y carece de efectos centrales porque no atraviesa la barrera remato-encefálica.

Los receptores cannabinoides se encuentran en el sistema nervioso entérico extrínseco e intrínseco, en los plexos submucoso y mientérico. Los receptores CB2 fueron identificados en la mayoría de neuronas del íleon y colon. El ligando endógeno de estos receptores es la **anandamida**, que es captada a la neurona por un transportador específico de la membrana, y sufre hidrólisis en la neurona para dar ácido araquidónico y etanolamina. La anandamida y sus receptores forman el "sistema endocannabinoide". Los receptores CB1 del cerebro y sistema entérico reducen la exocitosis del NT, y por lo tanto la motilidad GI. Reducen la exocitosis de Ach e inhiben la contracción no-adrenérgica/*no-colinérgica* de los músculos circular y longitudinal del intestino delgado.

### La actividad de receptores muscarínicos cambia en la inflamación intestinal

Varios agentes como acetilcolina (Ach), serotonina (5-HT), sustancia P, motilina y prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), inducen contracción intestinal. La Ach es el principal neurotransmisor para la contracción del músculo liso intestinal, en el cual se expresan 5 isoformas del receptor muscarínico: M1 a M5. Los receptores M2 y M3 están involucrados en la actividad contráctil. Ha sido sugerido que los receptores M2 soportan la actividad mediada por M3 e indirectamente contribuyen a la contracción del músculo liso. Recientemente se demostró que el receptor M2 se acopla a una proteína G<sub>i/o</sub> que puede directamente activar a una proteína c-src y mediante

esta a canales catiónicos no-selectivos y a los canales L de  $\text{Ca}^{2+}$ , a la proteína fosfoinositol-3-kinasa (PI3K) y a la proteína-kinasa C (PKC), y así contribuye a la contracción intestinal. Esto es diferente al mecanismo tradicional del M2 en corazón, que está acoplado a una Gi y logra hiperpolarización (Ohama y col., 2007).

En un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal se reduce la contracción del músculo liso circular inducida por Ach, pero la contracción del músculo liso longitudinal es la misma o está aumentada. Las diferencias en las respuestas a la inflamación entre los músculos circular y longitudinal se deberían al grado de dependencia hacia los receptores M2 que tiene cada uno de ellos. *La contracción del músculo liso circular parece estar mediada principalmente por receptores M3, mientras la mayor parte de la contracción del músculo liso longitudinal estaría mediada por receptores M2.* Entonces, la inflamación intestinal desplaza el balance de participación disminuyendo a los receptores M3 en el músculo liso circular y aumentando la exposición de M2 en el músculo liso longitudinal (Ohama y col., 2007).

### ***Canales de $\text{Ca}^{2+}$ en el síndrome de intestino irritable***

Como se explicó antes, la función de contractilidad normal del músculo liso intestinal está regulada por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L dependientes de voltaje (molecularmente denominados canales subtipo Cav1). Pero en la actualidad se ha descrito también la presencia gastrointestinal de los canales que originan la corriente de tipo T (subtipo Cav3.2) en los nociceptores viscerales, a los cuales se les asoció una función pro-nociceptiva, incrementando la hipersensibilidad colónica. El bloqueo farmacológico o genético de estos canales alivió el cuadro de SCI. Por otra parte, situaciones de modelos de estrés neonatal incrementaron la densidad de canales tipo L en el colon por “*up-regulation*” lo cual se asoció a hipermotilidad colónica en edades posteriores (De Carvalho Rocha y col., 2014).

### ***Canales de K en el intestino irritable***

El canal de  $\text{K}^+$  sensible a ATP (KATP) se activa por el descenso del nivel de ATP en situaciones de daño hipóxico, como pueden ser los estados inflamatorios intestinales, permitiendo el eflujo de  $\text{K}^+$ . Es un complejo compuesto de subunidades formadoras de poro y rectificadoras hacia el interior (Kir 6.1 y Kir 6.2) y de los receptores de sulfonilurea (SUR1 and SUR2). El canal Kir 6.1 está localizado en la membrana plasmática, mientras el Kir 6.2 está principalmente en el citosol. En el músculo liso intestinal estos canales son importantes para la regulación de la excitabilidad muscular. En el músculo colónico de ratón expuesto a un modelo de colitis experimental, un activador de KATP (levocromakalim) indujo corrientes que fueron significativamente mayores que en las células de intestino no inflamado, e incrementó la duración de los potenciales de acción. La expresión de mRNA de Kir 6.1 está “upregulada” en modelos de inflamación, sugiriendo que eso induce la reducida motilidad colónica durante el síndrome inflamatorio (Ohama y col., 2007).

## Metodología experimental para estudiar contractilidad intestinal in Vitro

Para evaluar la acción farmacológica que ejercen diferentes drogas en el músculo liso intestinal, en nuestro laboratorio utilizamos porciones aisladas de duodeno e íleon de rata (Kitchen, 1984; Blanco y col., 2013). Estas se acondicionan en cubas que poseen un sistema de doble camisa en el cual circula agua termostaticada a 37°C, y en su interior contienen 20 ml de solución Tyrode que es burbujeada constantemente con aire logrando un pH 8,2 (ver Figura 5). Los trozos de duodeno e ileon son sujetos longitudinalmente, por un extremo a un soporte fijo y por el otro a un transductor de fuerza isométrico (WPI Instruments, USA), manteniendo el tubo intestinal abierto para facilitar la circulación de solución y la oxigenación en el interior mucoso. El transductor de fuerza de cada cuba está acoplado a un amplificador de 4 canales para la adquisición analógica/digital (A/D) en computadora.

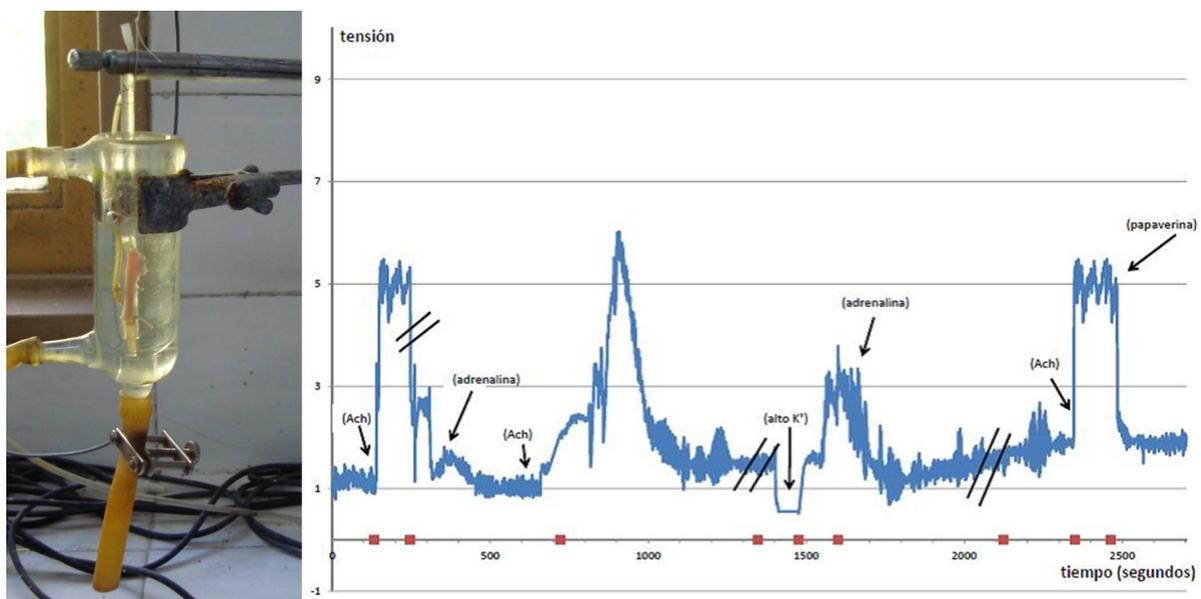


Figura 5. Se observa un preparado de duodeno aislado de rata dentro de una cuba termostaticada, sujeto a un transductor de fuerza y sumergido en solución Tyrode (izquierda) y un registro experimental de la contractilidad isométrica del mismo preparado expuesto al agregado de diferentes drogas: acetilcolina (ACh), adrenalina, alta [K<sup>+</sup>] (40 mM), y sin lavar nuevamente adrenalina. Después del lavado (//) se agregó ACh y sin lavar papaverina (derecha).

### Composición de la solución Tyrode

Solución Tyrode (Tyr): 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, burbujeado con aire (pH 8.2). En la preparación es importante recordar que el agregado del volumen calculado correspondiente de la solución madre de CaCl<sub>2</sub> (1 M) se realiza al final, sobre el volumen casi completo de la solución Tyrode, para evitar la precipitación. Si bien la solución puede prepararse unos días antes y mantenerse en heladera, es importante hacerlo sin el

agregado de glucosa, y ésta adicionarla el día del experimento, para evitar contaminación microbiana y precipitación.

Solución despolarizante de Tyrode-40 mM K<sup>+</sup>: se agregan 0.6 ml KCl 10% a los 20 ml de Tyrode contenidos en la cuba. Si bien esta solución se hace algo hiperosmótica no altera el tono basal ni el desarrollo de curvas concentración-efecto de Ca.

### Protocolos a evaluar y cuestiones para pensar

- a) Efectos de agonistas colinérgicos: acetilcolina, pilocarpina, carbacol, metacolina, betanecol. Comparar sus efectos contráctiles para una misma concentración (1 µg/ml de cuba). ¿Cuál es más efectivo? ¿Cuál es más duradero? ¿A qué se pueden deber las diferencias?
- b) Efectos de anticolinesterásicos: agregar al medio 0,15 mM de fisostigmina (40 µg/ml) en una cuba y 0,15 mM de neostigmina en otra. Qué respuesta se obtendrá en intestino? Habrá diferencias entre ambas? Fundamente. Dejarlas durante 5 minutos y, sin lavar agregar en una respectiva cuba Ach y en la otra carbacol en las mismas concentraciones que las ensayadas en el punto (a). ¿Qué respuestas se obtendrán en cada caso? Fundamentar con los mecanismos respectivos.
- c) Efectos de agonistas adrenérgicos: en dos cubas diferentes, comparar los efectos de agregar 20 µg/ml de adrenalina y de noradrenalina al intestino aislado. ¿Son las respuestas similares o diferentes? ¿Qué mecanismos están implicados?
- d) Sobre las respuestas del punto (c) sin lavar agregar Ach o carbacol, en las mismas concentraciones que en el punto (a) y comparar las respuestas con las iniciales: ¿Cómo interactuaron entre sí los agonistas colinérgicos y adrenérgicos?
- e) En una cuba nueva agregar Tyrode-40 mM K, registrar la respuesta fásica y tónica, y sin lavar agregar verapamilo o nifedipina para alcanzar una concentración de 1 µM. Evaluar y fundamentar la respuesta. ¿Podrá revertirse si se agrega Ach sobre dicha respuesta?

## Referencias

- Blanco, M., G.A. Colareda, C. van Baren, A. Bandoni, J. Ringuélet, A.E. Consolini. (2013). Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two chemotypes of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 149: 803-809.
- Bolton, T. B. (2006) Calcium events in smooth muscles and their interstitial cells; physiological roles of sparks. *Journal of Physiology* 570.1, 5-11.
- Costa, M., Dodds, K. N., Wiklendt, L., Spencer, N. J., Brookes, S. J. H., Dinning, P. G. (2013) Neurogenic and myogenic motor activity in the colon of the guinea pig, mouse, rabbit, and rat. *American Journal of Physiology- Gastrointestinal & Liver Physiology* 305, G749-G759.

- de Carvalho Rocha, H. A., Vasconcelos Dantas, B. P., Leite Rolim, T., Araújo Costa, B., Correia de Medeiros, A. (2014) Main ion channels and receptors associated with visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Annals of Gastroenterology* 27, 200-206.
- Goodman & Gilman. (2014) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. XII Edición. Buenos Aires: Interamericana.
- Karaki, H. , Wiess, G. (1983). Mini-review: Calcium release in smooth muscles. *Life Sciences* 42, 111-122.
- Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsuj-Saito, M., Amano, K., Harada, K., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K., Sato, K. (1997). Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacological Reviews* 49(2), 157-230.
- Kitchen, I. (1984). *Textbook of in vitro practical pharmacology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- McHale, N., Hollywood, M., Sergeant, G., Thornbury, K. (2006). Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. *Journal of Physiology* 570(Pt 1), 23-28.
- Ohama, T., Hori, M. Ozaki, H. (2007). Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced? *Journal of Smooth Muscle Research* 43(2), 43-54.

# CAPITULO 4

## Farmacodinamia del músculo liso genitourinario y respiratorio

*Germán A. Colareda y Alicia E. Consolini*

*Ser, y nada más. Respirar: basta. ¡Alegría, Alegría por doquier...!*

WALT WHITMAN. Canto a mí mismo.

### Características fisiológicas y farmacológicas del útero

El útero está inervado por nervios simpáticos, y además por algunos nervios parasimpáticos. Por ello, tiene receptores tanto adrenérgicos como muscarínicos. Es un tejido atípico dentro de los músculos lisos y la respuesta varía entre especies. Hay un período latente luego de la adición de un agonista hasta que se inicia la contracción, la respuesta es todo o nada, y la contractura (o respuesta tónica) no se mantiene aun cuando permanezca el agonista en el medio (a diferencia de aorta e intestino). Por el contrario, el tejido tiene una actividad eléctrica marcapaso que origina contracciones fásicas muy amplias seguidas por relajaciones hasta el tono basal (Figura 1). Esta actividad espontánea se reduce bajando la temperatura desde 37 a 32°C, usando un medio extracelular con baja [Ca]<sub>e</sub> (solución de Jalon) e induciendo el estado de estro del animal por administración subcutánea de un estrógeno 24 horas antes del experimento (Kitchen, 1984).

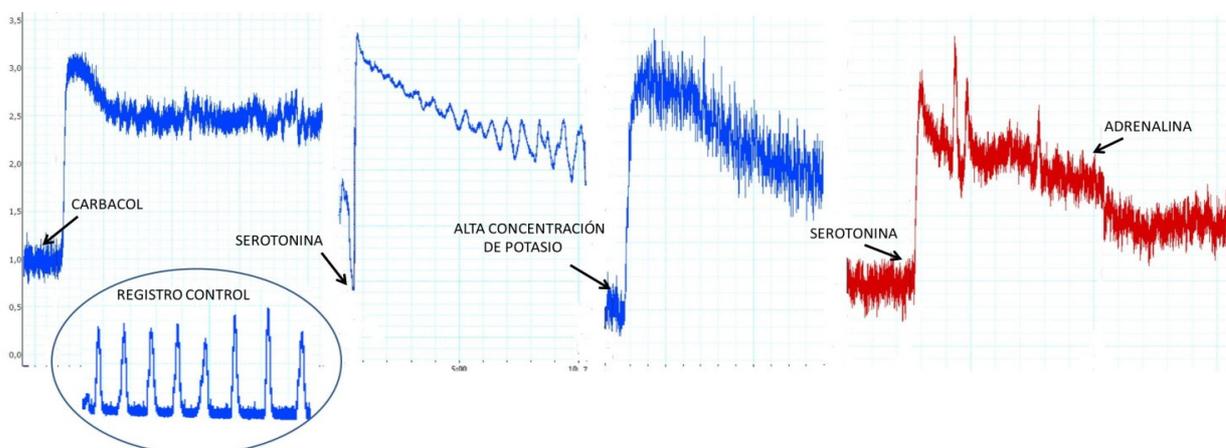


Figura 1: Registros experimentales obtenidos en útero de rata aislado. Observar las espigas de contracción en el registro control amplificado (en el óvalo), y el desarrollo de una contractura por el agregado de altas concentraciones de los agonistas carbacol y serotonina o de 40 mM de KCl. Notar la relajación de esas contracturas cuando se agregan adrenalina o papaverina. Leer los mecanismos correspondientes en el texto.

## Origen de la actividad fásica del útero

Las ondas fásicas espontáneas se asocian a despolarizaciones, las cuales se reducen durante el período de embarazo. La despolarización es provocada por la activación de canales de calcio tipo L (L-Ca), mientras la relajación fásica es provocada por la inactivación de dichos canales y por la activación de varias clases de canales de potasio, lo cual provoca repolarización o hiperpolarización. Entre dichos canales de  $K^+$  se han encontrado en el útero los canales de K activados por Ca de gran conductancia o "big  $K^+$  channels" (BK), los canales de  $K^+$  sensibles a ATP (KATP), y al menos un canal de  $K^+$  rectificador hacia el interior (Smith y col. 2007).

Los BK son los responsables de la repolarización del potencial de acción uterino provocado por agonista o estímulo eléctrico en humanos, pero no en ratas. En efecto, el uso de bloqueantes selectivos de los BK como iberiotoxina (IbTx 1-100 nM) no alteró la actividad rítmica basal en úteros de ratas normales ni gestantes (Aaronson y col., 2006). Pero en las ondas fásicas basales o espontáneas del útero en condición normal o de embarazo se encontró que participan los canales de  $K^+$  activados por voltaje (Kv), tanto en rata (Aaronson y col., 2006) como en ratón (Smith y col., 2007). Estos canales limitan y revierten la despolarización provocada por la actividad marcapaso. El miometrio es el único entre los músculos lisos capaz de activar una corriente hacia el exterior (tipo A) que tiene un umbral de activación igual o más negativo que el potencial de membrana en reposo (-55 mV). Esta corriente tipo A es conducida por los canales Kv, que son sensibles a los bloqueantes 4-aminopiridina (4-AP) y al tetraetilamonio TEA (5-10 mM) (Aaronson y col. 2006). Esta corriente desaparece en el miometrio gestante humano y de ratones pero no en el de ratas. La reducción de esta corriente genera un potencial de reposo menos negativo (despolarización), mayor tono contráctil de reposo e insensibilidad al 4-AP, lo cual prepara al miometrio para el trabajo de parto (Smith y col. 2007).

## Agonistas en el útero

### Agonistas contráctiles

El útero es rico en receptores muscarínicos de tipo M3, para la estimulación parasimpática in vivo. Los agonistas que provocan contracción en el útero aislado, actuando sobre receptores M3, son: **acetilcolina (Ach)**, **carbacol**, **metacolina** y otros agonistas colinérgicos.

Por otra parte, el útero responde a otros agonistas: **oxitocina**, **serotonina (5-HT)** y **prostaglandinas (PGF2 $\alpha$ )**. Darios y col. (2012) compararon la respuesta del útero de rata a estos agonistas, encontrando que todos alcanzaban la contracción máxima en una curva concentración-respuesta (CCR) pero el orden de potencia entre ellos (comparando las pCE50) era: oxitocina (8,81) > serotonina (7,09) > PGF2 $\alpha$  (6,73) > carbacol (5,62).

Respecto a los mecanismos de dichos agonistas, todos los receptores activan las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, siendo la oxitocina y la prostaglandina  $\text{PGF2}\alpha$  los agentes oxitócicos naturales encargados de desencadenar el parto, mientras Ach y 5HT ejercen un rol modulador menor en condiciones no gestantes.

La Figura 2 muestra los mecanismos contráctiles, que son respectivamente los siguientes:

a) Los **receptores de oxitocina** (llamados OXT) son del tipo acoplado a proteína G (GPCR) muy relacionados a los receptores de vasopresina (V1 y V2). En el miometrio se acoplan a Gq/G11 y activan la vía PLC-IP3-DAG que activa a los canales de calcio voltaje-dependientes y despolariza y aumenta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La respuesta es un aumento de la fuerza y frecuencia de las contracciones rítmicas, aunque a altas concentraciones genera contracción tónica sostenida. Además, estimula a la PLA2 mediando la producción local de prostaglandinas, lo cual sinergiza la acción contráctil. En terapéutica, la **oxitocina** puede emplearse en goteo intravenoso para inducir o facilitar el trabajo de parto.

b) La **prostaglandina  $\text{PGF2}\alpha$**  induce el trabajo de parto actuando en receptores FP subtipos A y B, que están acoplados a una Gq que activa a la PLC, lo cual conduce a la formación de IP3 y DAG, y este último activa PKC. Ambos segundos mensajeros incrementan el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol.

c) La **serotonina** ejerce una acción estimulante a nivel uterino como en el intestino, en los receptores 5-HT2A y 5-HT2C, que están acoplados a Gq y al aumento de los niveles de PLC y PLA2. La PLC cataliza la formación de IP3 y DAG, y éste último activa PKC, por lo cual ambos segundos mensajeros incrementarán el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. La PLA2 estimula la formación del ácido araquidónico, que será sustrato de las ciclooxigenasas (COX) para la síntesis de prostaglandinas. De esta manera, se produce un sinergismo entre 5-HT y  $\text{PGF2}\alpha$ .

Los receptores 5-HT2A y 5-HT2C del útero pueden ser antagonizados por fármacos como la **metisergida** y la **ketanserina**. Sin embargo, la aplicación terapéutica más relacionada es la del uso de **alcaloides del cornezuelo de centeno** para tratar la hemorragia puerperal. Estos alcaloides aumentan considerablemente la actividad motora del útero, en cuanto a fuerza y frecuencia, seguido de relajación normal. Pero con el aumento de la dosis se incrementa el tono de reposo, pudiéndose alcanzar una contractura sostenida. Esto hace que no sean adecuados para inducir el trabajo de parto, pero sí para detener la hemorragia en el puerperio. El útero grávido es más sensible que el no gestante. De estos alcaloides se emplean en terapéutica la **ergonovina** y la **ergotamina**, aunque la primera es la más activa y menos nociva, así como su derivado semisintético **metilergonovina** (Goodman y Gilman, 2014).

d) la **acetilcolina** (Ach) actúa en receptores muscarínicos M3, contribuyendo al tono del miometrio gestante y no gestante. Mediante el acoplamiento a Gq-PLC-IP3/DAG-PKC incrementa el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol, y la frecuencia y amplitud de las contracciones rítmicas uterinas. El receptor M3 se acopla a Gq, y ésta a la enzima efectora fosfolipasa C (PLC), como resultado se cataliza la conversión de fosfoinosítidos de membrana (PIP2) a

inositol-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Este último activa a la proteinquinasa C (PKC) la cual fosforila a los canales de calcio voltaje-dependientes tipo L, con lo cual se incrementa su frecuencia de apertura y consecuentemente el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. Esto origina que se aumente la frecuencia y amplitud de las contracciones rítmicas uterinas, y en ciertas concentraciones altas del agonista se genere cierta contracción tónica poco estable.

### **Agonistas relajantes**

a) La **estimulación adrenérgica**, están presentes los **receptores  $\beta 2$**  cuya activación desencadena relajación. El efecto es 100 veces más potente con la adrenalina circulante y 1000 veces con el isoproterenol (pCE50 9,5) que con la noradrenalina proveniente de las terminaciones del sistema nervioso simpático (pCE50 6,5) dada la baja afinidad de NA por receptores  $\beta 2$ . Este efecto se mantiene aún en el útero grávido. El mecanismo del receptor  $\beta 2$  es el acoplamiento a una proteína Gs, que activa a la adenilato-ciclasa, a su vez encargada de catalizar la conversión del ATP en AMPc. Este segundo mensajero activa a proteínaquinasa A (PKA), la cual fosforila a la quinasa de la cadena liviana de miosina (KCLM), efecto que reduce la sensibilidad de esta enzima por el complejo Ca-calmodulina, y así resulta relajante para útero y cuello o cérvix. En cambio, los **receptores  $\alpha$ -adrenérgicos** pueden producir estimulación y contracción del cervix durante el embarazo (Darios y col., 2012).

Los niveles de AMPc también pueden aumentarse por inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa, enzima que lo degrada a 5'-AMP. Este mecanismo es típico de algunos compuestos derivados de plantas como la *papaverina*, la **cafeína** y la **teofilina**, y trae como resultado la relajación del músculo liso uterino.

b) La participación del **óxido nítrico (NO)** se evaluó mediante la adición de nitroprusiato de sodio (NPS) que lo libera. En útero el NPS causó modesta relajación (un 10-20%) a una pCE50 de 9 (Darios y col. 2012).

c) El **neuropéptido CGRP** también provocó relajación de un 40% de la contracción provocada por carbamilcolina, con pCE50 9,2.

El orden de potencias de los agonistas relaxantes fue similar entre el útero y el cervix con la siguiente secuencia: isoproterenol > CGRP > SNP > NE.

d) las **prostaglandinas** que producen relajación en el útero y cervix son: **PGE2, PGI2 y 6-ceto-PGF1 $\alpha$** . El mecanismo es por estimulación de los receptores relajantes de prostanoïdes denominados EP2 y EP4 (para PGE2) e IP (para PGI2) que incrementan la producción de AMPc celular vía Gs. Además, los receptores EP2 y EP4 para PGE2 pueden inducirse ante un estímulo inflamatorio.

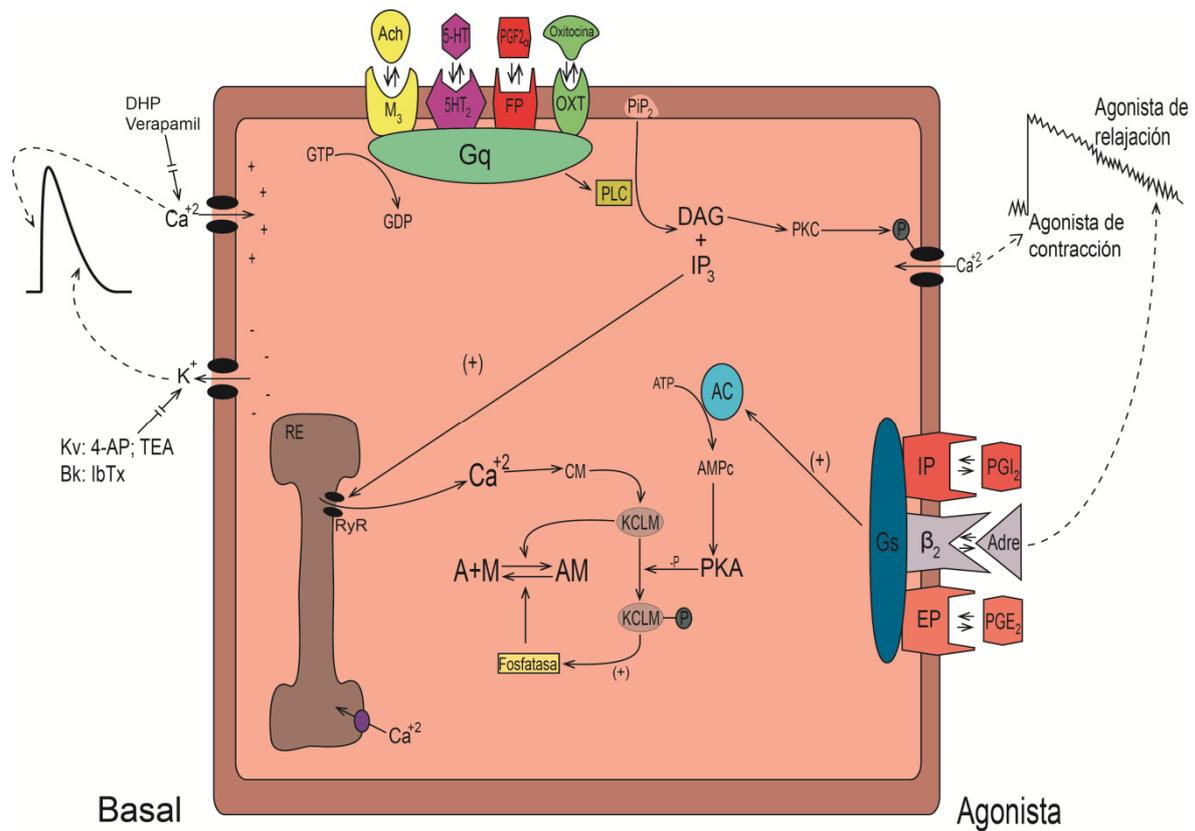


Figura 2: Esquema que representa las vías intracelulares y los receptores que pueden ser estimulados en el útero para regular su contractilidad y relajación (a la derecha). A la izquierda se muestran los canales iónicos que determinan la actividad basal con espigas de contractilidad espontáneas. Se indican también los agonistas y algunos antagonistas de receptores o canales.

## Preparado de útero aislado

Los dos cuernos uterinos extirpados post-mortem de una rata adulta se dividen en 4 partes (2 mitades de cada cuerno uterino) obteniendo segmentos de 2 a 3 cm de longitud (Kitchen, 1984). Cada uno se acondiciona en una cuba de doble camisa termostatazada a 34-35°C, sujetándolo en un extremo inferior fijo y un extremo superior sujeto por medio de un hilo a un transductor de fuerza (puede emplearse un isométrico o uno isotónico). La cuba contiene 20 ml de la solución de Jalon burbujeada constantemente con aire.

Se registra la tensión desarrollada por los tejidos mediante el transductor de fuerza acoplados a un preamplificador, con detección analógica-digital en un programa de adquisición en computadora (Figura 1).

Los preparados se someten a una precarga de 1g y se estabilizan durante al menos 30 minutos, con cambios periódicos del medio, antes de realizar un protocolo.

Solución de Jalon: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (10%) 2.6 ml, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (5%) 1.3 ml, glucosa 1 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 1 g/l, CaCl<sub>2</sub> (1 M) 1.8ml, todos por litro de solución.

#### Protocolos a realizar y cuestiones para pensar

- Registro de actividad fásica basal. Agregar verapamilo 1 μM. Observar y explicar. Lavar
- Registro de actividad fásica basal. Agregar diazóxido 1 μM. Observar y explicar. Lavar
- Agregar carbacol o Ach a 10 μg/ml cuba. Observar cómo se modifica la actividad fásica
- Lavar, y agregar solución de Jalon con 40 mM K. En la respuesta tónica, agregar adrenalina 10 μg/ml cuba. Explicar los mecanismos de los efectos observados
- Post-lavado, agregar serotonina (5-HT) 10 μg/ml cuba. A los 5 minutos, agregar papaverina 1 μM.

Fundamentar todos los efectos observados.

## Características fisiológicas y farmacológicas de la vejiga urinaria

La vejiga es una víscera formada principalmente por dos músculos: el detrusor y el trígono. El detrusor es el músculo que forma la pared de la víscera, y su contracción promueve la expulsión de la orina y el vaciamiento de la vejiga. El trígono hace las veces de esfínter, permitiendo la salida de la orina hacia la uretra y los uréteres. Ambos tipos de músculos lisos reciben una regulación externa a cargo del sistema nervioso autónomo, que mediante las ramas parasimpática y simpática dispara simultáneamente la contracción del detrusor y la relajación del trígono para promover la micción, o los efectos opuestos durante los períodos de llenado de la vejiga.

Además, estos músculos lisos tienen un potencial de membrana característico, regulado por diversas corrientes iónicas. En el detrusor juegan un rol importante los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje y de Ca, y conocidos como "*big channels*" por su gran conductancia (BK, BKCa, MaxiK, Slo1, or KCa1.1). Estos canales BK controlan la excitabilidad y contractilidad del detrusor, manteniendo el potencial de reposo (Em) y dando forma a la fase de repolarización de los potenciales de acción espontáneos que determinan la **automaticidad** o ritmo contráctil espontáneo. En el detrusor estos canales tienen complejos mecanismos regulatorios que involucran señales integradas de Ca<sup>2+</sup> intracelular, proteinquinasas, fosfodiesterasas, y estrechas interacciones funcionales con los receptores muscarínicos y los β-adrenérgicos. En algunas patologías de la vejiga como la hiperactividad del detrusor está implicada una alteración del canal BK (Petkov, 2014). Además, en las contracciones fásicas disparadas por estimulación eléctrica de campo participan canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP (KATP) similares a los de los vasos sanguíneos. El abridor de canales KATP **pinacidilo** puede provocar relajación y reducción de la frecuencia peristáltica del detrusor sensibles a glibenclamida, un inhibidor de los KATP (Philyppov y col., 2016).

La inhibición farmacológica de la fosfodiesterasa PDE1 atenúa la excitabilidad del detrusor humano y la contractilidad en modo de espigas espontáneas, por activar los canales BK mediante la vía de un mecanismo dependiente de PKA. También hay interacciones entre las vías de la PDE1 y los receptores muscarínicos en el detrusor humano. La inhibición de la PDE1 puede ser una novedosa estrategia terapéutica para el tratamiento de la vejiga hiperactiva asociada al detrusor hiperactivo (Xin y col., 2016). Este efecto es ejercido por fármacos nuevos como el **sildenafil**, y otros antiguos como la **papaverina** y las **metilxantinas**.

Las respuestas contráctiles de las vejigas de mamífero son inducidas por una combinación de neurotransmisores: colinérgico (**Ach**) y no-adrenérgico / no-colinérgico (NANC, como el **ATP**). Esta combinación también se da en las vejigas de pacientes con hipertrofia prostática. Las contracciones del detrusor son producidas por la activación de neuronas parasimpáticas, las cuales liberan acetilcolina (Ach) que activa a los receptores muscarínicos de tipo M3.

Los **antagonistas cálcicos** suprimen las contracciones colinérgicamente desarrolladas de la vejiga y las contracciones mediadas por NANC. Sin embargo, los efectos adversos del grupo de fármacos tipo dihidropiridinas (DHP) como nifedipina, nitrendipina, amlodipina, principalmente los debidos a vasodilatación como mareos por hipotensión y taquicardia, sumada a la limitada potencia en la incontinencia urinaria, desalentaron su uso en esta patología. Una alternativa apareció con fármacos con ambas acciones: **anticolinérgico y antagonista de calcio**, ya que ambos efectos actúan sinérgicamente para reducir las contracciones de la vejiga anormales causadas por la inestabilidad o hiperreflexia del detrusor, con mínimos efectos adversos asociados a la baja actividad en cada uno de esos mecanismos por separado, y a la incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) como otros anticolinérgicos. El fármaco más representativo de esta clase es la oxibutinina que tiene potente actividad anticolinérgica y débil actividad antagonista de calcio (Hamada y col. 1997). Más recientemente, un derivado fluorinado del pinacidil llamado **flocalina**, que es un nuevo abridor de KATP, también provocó relajación de la contractura evocada por alta  $[K^+]$  pero no totalmente sensible a glibenclamida sino debida a un 20% de inhibición de la corriente de  $Ca^{2+}$  (Phillyppov y col., 2016) lo cual representa un nuevo fármaco útil para tratar la vejiga hiperactiva.

La estimulación eléctrica del nervio pélvico provoca contracciones bifásicas en la vejiga urinaria, compuestas de una contracción inicial rápida seguida de una contracción tónica (Theobald 1983). La fase contráctil inicial (o contracción fásica) fue inducida por el transmisor NANC **ATP, que activa receptores de tipo purinérgico P2Y** que se acoplan a la formación de IP3 / DAG, induciendo la liberación transitoria de  $Ca^{2+}$  intracelular y el influjo de  $Ca^{2+}$  por canales L. La fase estable (contracción tónica) fue debida a la **acetilcolina en receptores M3**. Ambos neurotransmisores son liberados de las terminales del nervio pélvico. La contracción fásica inicial es fuertemente resistente a atropina pero es suprimida por los antagonistas de calcio, y la contracción tónica es suprimida por atropina y por oxibutinina.

Un gran porcentaje de vejigas de pacientes con hipertrofia prostática y cistitis intersticial mostraron contracciones resistentes a la atropina.

## Preparado de vejiga aislada

Es posible aislar la vejiga de rata, la cual será dividida en 4 partes siguiendo su eje longitudinal. Cada uno de esos pequeños segmentos se dispondrá longitudinalmente en una cuba para sujetarse a un transductor de fuerza. Se sumergirán en solución Tyrode (ya descrita) con 2.5 mM Ca, y a precarga de 1 gramo. Luego de una estabilización de al menos 30 minutos se podrán obtener respuestas contráctiles, según se muestra en la Figura 3.

### Protocolos a realizar y cuestiones para pensar

- Aplicación de estímulo de campo (50 v- 2 ms en trenes de 20 pulsos cada 10 seg o 0.1 Hz). Observar las contracciones fásicas
- Agregado de Ach o carbacol. Puede hacerse en concentraciones crecientes. Lavar
- Agregado de nifedipina 1  $\mu$ M, y a los 5 minutos agregar la misma concentración de carbacol o Ach que en el inicio. Lavar. Comparar ambas respuestas
- Agregado de atropina 1  $\mu$ g/ml, y a los 5 minutos agregar la misma concentración de carbacol o Ach que en el inicio. Lavar. Comparar ambas respuestas
- Agregado de oxibutinina 1  $\mu$ g/ml, y a los 5 minutos agregar la misma concentración de carbacol o Ach que en el inicio. Lavar. Comparar ambas respuestas
- En el reposo, agregar KCl 40 mM al medio, registrar la respuesta tónica. Sin lavar agregar verapamilo 1  $\mu$ M.
- Comparar todas las respuestas relajantes, y fundamentar posibles diferencias.

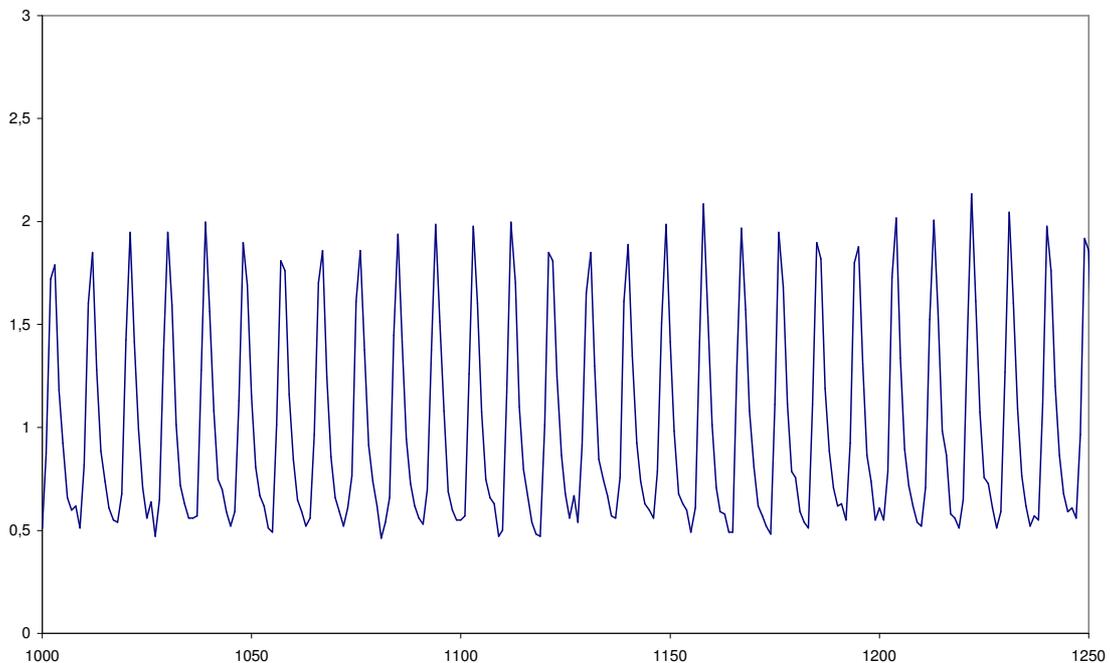


Figura 3: Registro experimental obtenido en vejiga de rata aislada y expuesta a estímulo eléctrico de campo (50 v-2mseg a intervalos de 10 seg.). Observar las espigas de contracción. Leer los mecanismos correspondientes en el texto.

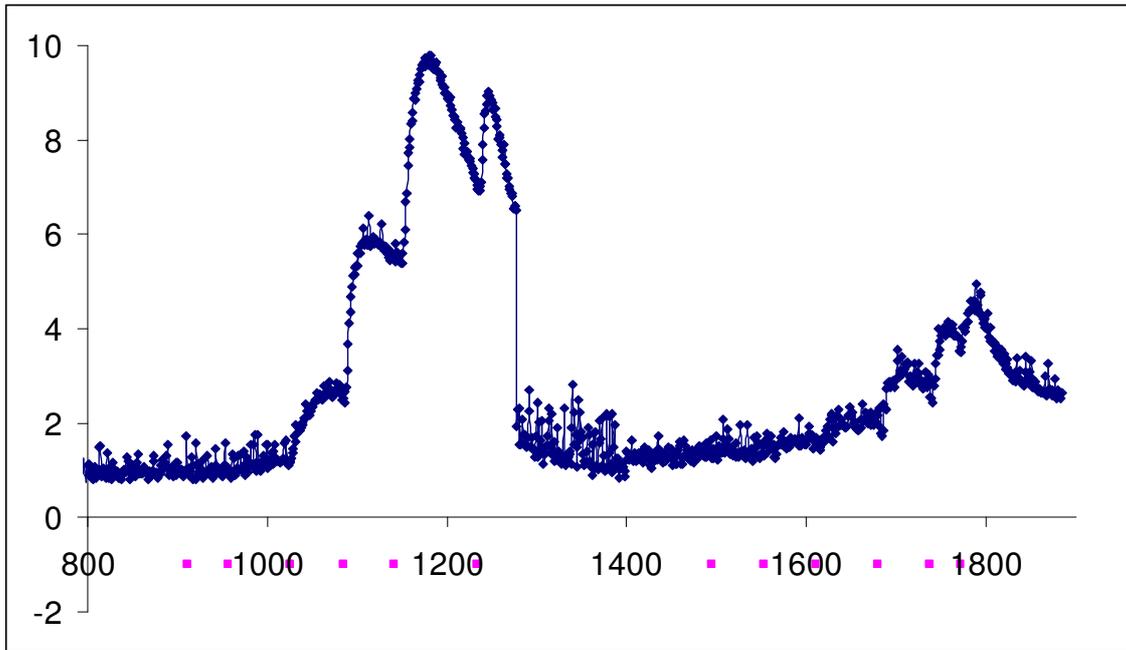


Figura 4: Registro experimental obtenido en vejiga de rata aislada estimulada por el agregado de concentraciones crecientes de carbacol (a tiempos señalados con un punto rosa) en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de 1  $\mu$ M de verapamil. Observar los cambios en la contracción y explicar los mecanismos correspondientes.

## Conducto o vaso deferente

El conducto o vaso deferente se extiende entre el epidídimo y la próstata, y a través de la estimulación simpática promueve la eyaculación en el macho. Está compuesto por una capa de músculo liso circular que se encuentra entre dos capas de músculo liso longitudinal. En todos los experimentos se mide solo la contracción del músculo liso longitudinal, ya que en esta capa puede generarse una tensión considerable.

La inervación autonómica del conducto deferente es principalmente simpática, ya que en este preparado se encuentran las terminaciones nerviosas del nervio hipogástrico sobre el músculo liso. De todos modos, esta característica hace que este preparado sea una buena herramienta para el estudio de las drogas de acción en la terminal axónica adrenérgica formada por vesículas, transportadores, enzimas de síntesis, canales, receptores pre- y post-sinápticos, etc. Posee los ganglios simpáticos en la pared del músculo y neuronas post-ganglionares cortas, y puede responder con contracciones a la estimulación "de campo" con altos voltajes y frecuencia aplicados sobre la solución. Esta herramienta induce la conducción en ganglio y nervio, disparando la exocitosis de noradrenalina (NA). Finalmente la contracción se desarrolla por activación del único receptor presente en el músculo liso del conducto que es el  $\alpha_1$ -adrenérgico.

Los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos sobre el músculo liso conducen a contracción por la vía de la PLC, IP3 y DAG (ver detalles en el capítulo anterior). La respuesta contráctil tiene dos fases: una transitoria rápida o fásica y una estable o tónica. La primera se ha asociado con la participación del **ATP** (un co-transmisor de la noradrenalina que se incluye en las mismas vesículas) actuando como agonista en sus propios receptores purinérgicos de tipo **P2X**. En la fase tónica participa el mecanismo  $\alpha_1$  de la **NA**, y su tono es dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Ventura, 1998; Burnstock y Verkhatsky, 2010).

Además, el vaso deferente también tiene una rica población de nervios colinérgicos (Cuprian y col. 2005), sin embargo su rol y contribución a las contracciones bifásicas de este preparado aún no están claras, ya que los efectos de la acetilcolina (Ach) en este preparado aún no se conocen en detalle y los resultados son contradictorios (Koslov y Andersson, 2013). Algunos trabajos reportan que las contracciones generadas por estimulación eléctrica (EE) fueron inhibidas por atropina, mientras otros encontraron que atropina tiene poco o ningún efecto (Cuprian y col., 2005; Wallace y col., 2015). Análogamente, algunos autores encontraron que la aplicación exógena de drogas colinérgicas en vaso deferente humano fue inactiva, mientras otros encontraron que Ach indujo una contracción dependiente de la concentración. También se ha sugerido un rol modulador de la Ach en el vaso deferente. Algunos autores sugieren que carbacol, Ach y neostigmina potenciaron las contracciones de vaso deferente de ratón, rata y cobayo bajo EE, pero estas drogas no ejercen efecto en el vaso deferente aislado sin EE (Wallace y col., 2015).

La fase tónica de la contracción generada en presencia de EE es inhibida por **prazosina** (un antagonista  $\alpha_1$ ), y por **guanetidina** (un inhibidor de la liberación de NA, que depleciona las vesículas). Además esta fase fue bloqueada por atropina (antagonista muscarínico no selectivo) y por 4-DAMP (antagonista selectivo del receptor M3). Con estos resultados los investigadores sugieren que la **fase tónica de la contracción generada por EE está mediada por NA** (actuando sobre los receptores  $\alpha_1$  postsinápticos) y que **acetilcolina aumenta la descarga de NA** al actuar sobre receptores M3 pre-sinápticos (ver figura 4). Ach también aumenta la fase fásica de la contracción generada por EE, pero esta fase de la contracción no fue bloqueada por prazosina. En cambio, la fase fásica fue bloqueada por  $\alpha,\beta$ -metilen-ATP (un análogo del ATP que desensibiliza al receptor  $\text{P}_{2X}$ ), lo que sugiere que **el componente fásico o transitorio de la contracción está mediada por los receptores P2X**.

Además, a nivel de las terminaciones simpáticas insertas en el preparado pueden evidenciarse mecanismos como los receptores pre-sinápticos  $\alpha_2$  adrenérgicos (que inhiben la liberación de NA) y los sistemas de recaptación de NA y aminas indirectas. En el conducto deferente expuesto a EE de campo pueden evidenciarse:

- a) **Los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos pre-sinápticos**: pueden estimularse por muy bajas [NA] (0.01  $\mu\text{g/ml}$ ) dado que tienen mayor afinidad que los post-sinápticos. Esta intervención origina una reducción de las contracciones en espiga. En cambio, el agregado a la cuba de yohimbina (antagonista selectivo  $\alpha_2$  adrenérgico) aumenta las contracciones transitorias, sin cambios en el tono basal.

- b) **Los transportadores de recaptación 1 (de NA a la terminal axónica)**: la inhibición de los mismos con cocaína o con antidepresivos tricíclicos (imipramina, desipramina, amitriptilina) induce que una mayor fracción de la NA liberada por exocitosis permanezca en el espacio sináptico, potenciando así la contracción en espigas del conducto deferente.
- c) **Receptores pre-sinápticos de sustancias opioides ( $\mu$  y  $\delta$ )**: la estimulación por morfina o análogos opioides inhibe la respuesta contráctil a la EE, ya que estos receptores se acoplan a una proteína  $G_i$ , que al hidrolizar GTP se acopla a las vías de inhibición de AC y activación de  $I_K$  provocando hiperpolarización de la terminal axónica e inhibición de la corriente de  $Ca^{2+}$ . Consecuentemente, se reduce la exocitosis de NA.

En la figura 5 se muestra la respuesta frente al agregado de noradrenalina (NA) del vaso deferente aislado de rata sin y con estímulo eléctrico (observar las diferencias en ambas respuestas).

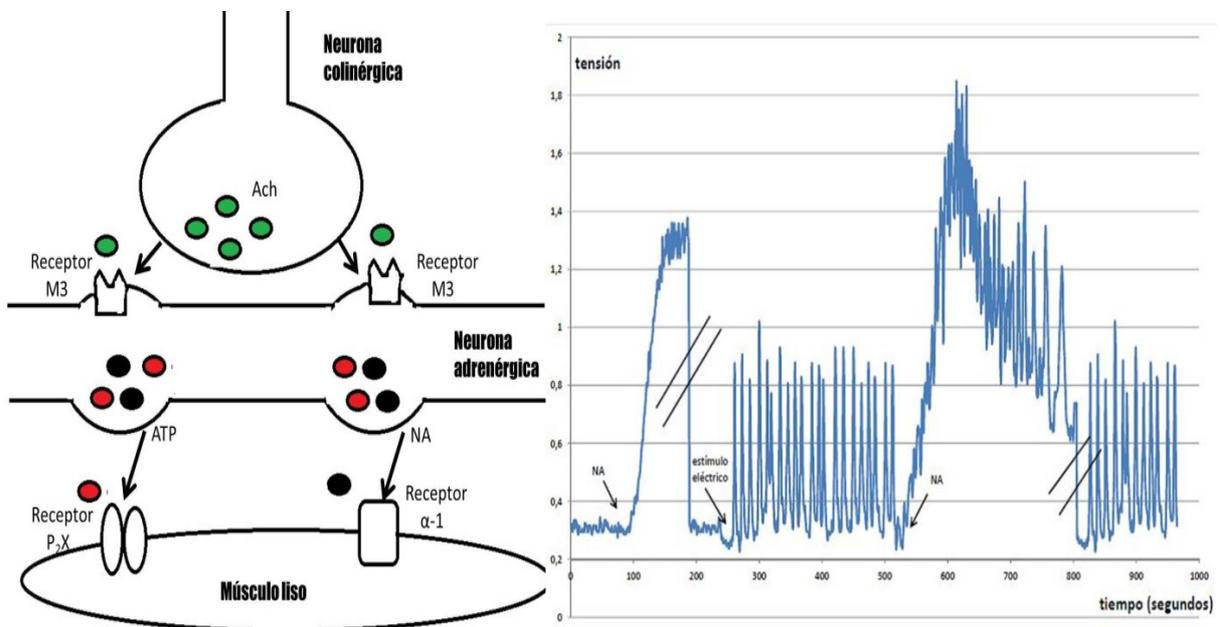


Figura 5. Esquema del preparado de conducto deferente aislado (izquierda) y un registro experimental de las respuestas de este preparado expuesto al agregado de noradrenalina (NA), luego a estímulo eléctrico (EE) y finalmente a una combinación de ambos (derecha).

Además, en los preparados de conducto deferente con EE o sin EE se pueden caracterizar los efectos de las aminas de acción indirecta y de los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos:

- i) Las **aminas de acción indirecta, como pseudoefedrina y anfetamias** ingresan a la terminal axónica a través del sistema de transporte de captación-1, que está conducido por el gradiente de  $Na^+$  axónico y es la vía natural de recaptación de NA. Durante esa captación la amina indirecta se intercambia en relación 1:1 con NA que proviene de las vesículas que están en estrecha proximidad con el transportador de recaptación-1. En las vesículas, también ocurre la captación de 1 molécula de amina indirecta en intercambio por 1 molécula de NA a través del

transportador conducido por un gradiente de  $H^+$ . El resultado final de ambos intercambios es que las vesículas pierden NA por un transporte facilitado diferente a la exocitosis, y se cargan de amina indirecta. Consecuentemente, se produce la estimulación de los receptores post-sinápticos  $\alpha$ 1-adrenérgicos por la NA liberada indirectamente. Pero agregados repetidos de la amina indirecta sufrirán una respuesta contráctil progresivamente disminuida por la pérdida de NA en las vesículas, en un fenómeno de tolerancia denominado **taquifilaxia**. In Vitro, esta situación puede revertirse por el agregado de NA exógena. La misma situación puede ocurrir in vivo por el uso repetido crónicamente de pseudoefedrina (como descongestivo nasal) o de las anfetaminas (como anorexígeno) y puede revertirse por la suspensión del uso, lo cual permitirá al organismo reponer por síntesis los niveles de NA de las vesículas.

ii) el agregado de un agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico directo (NA, adrenalina, fenilefrina, metoxamina) estimula directamente los receptores post-sinápticos produciendo una contracción tónica estable hasta el momento de la remoción o lavado del fármaco del medio

Es posible determinar si un fármaco que estimula receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos en el conducto deferente es agonista directo o amina de acción indirecta, mediante los siguientes tratamientos:

- 1) Adicionar al medio un inhibidor de la recaptación-1 (desipramina o cocaína  $1 \mu M$ ): el sucesivo agregado de la droga a analizar (sin lavado previo) recibirá un aumento de su contracción si actuaba en forma directa, o una disminución de la contracción si actuaba en forma indirecta. Fundamentar los mecanismos.
- 2) Mediante reserpización de una rata 24 horas antes del experimento: la reserpina bloquea el transportador de captación vesicular de NA, con lo cual lentamente depleciona las vesículas de NA. Al extraer el conducto deferente y ensayarlo in Vitro se observará que un agonista directo desencadena un efecto comparable al visto en rata control (sin reserpina), mientras una amina indirecta desarrollará una muy escasa o nula contracción. Fundamentar los mecanismos.

## **Preparado de conducto deferente**

En nuestro laboratorio se utiliza este preparado para evaluar la acción farmacológica de drogas de acción adrenérgica. Para ello se sujeta el vaso deferente aislado de rata por ambos extremos (de manera similar al preparado de duodeno e íleon aislado) y se introduce en una cuba que contiene solución Krebs para vaso deferente, esta cuba posee un sistema de doble camisa que permite mantener la temperatura constante a  $32^\circ C$  (en la cual la contractilidad es óptima) y se burbujea la solución con gas carbógeno ( $95\% O_2$  y  $5\% CO_2$ ) para lograr un pH 7.4. La preparación requiere un manejo delicado, evitando utilizar pinzas para no dañar el tejido. Uno de los extremos del preparado está sujeto a un transductor de fuerza isométrico, lo que nos permite registrar las contracciones en función del tiempo. Si los protocolos se realizan en presencia de estimulación eléctrica, puedo evidenciar los efectos de drogas que afectan la exocitosis de las vesículas de NA.

### Protocolos a realizar y cuestiones para pensar

- a) Registro de la actividad basal con EE de contracciones en espigas. ¿A qué se debe la relajación de cada espiga? Fundamentar mecanismos
- b) Registro de actividad basal con EE. Agregado de yohimbina durante 5 minutos. Luego agregado de imipramina. Observar y explicar los efectos.
- c) Registro de la actividad basal con EE. Agregado de NA 0.3 µg/ml cuba. Observar las 2 respuestas de NA endógena y exógena.
- d) Registro de la actividad basal con EE. Agregado de anfetamina (fenilpropanolamina) 10 µg/ml cuba durante 5 minutos. Luego adición de prazosina 5 µM. Explicar efectos.
- e) Registro de la actividad basal sin EE. Agregado de anfetamina (fenilpropanolamina) 10 µg/ml cuba durante 5 minutos. Lavar, y a los 5 minutos nuevo agregado de anfetamina. Lavar y reagregar anfetamina, y luego hacer un cuarto agregado. Lavar y agregar NA 1 µg/ml cuba. Explicar el origen de los efectos.

## Músculo liso respiratorio: tráquea y bronquios

La tráquea comprende una serie de anillos incompletos de cartílago, enlazados por capas de músculo liso. El tono de la tráquea, así como también de los bronquios es controlado principalmente por el nervio vago. Los nervios parasimpáticos que forman parte del nervio vago generan un tono de base en el músculo liso bronquial (MLB) que es estable pero fácilmente reversible (Kesler y Canning, 1999). Las fibras postganglionares colinérgicas y las fibras no adrenérgicas /no colinérgicas (NANC) que inervan el árbol respiratorio, no solo regulan el tono del MLB sino que también regulan la secreción glandular y el tono de los vasos sanguíneos. No hay inervación simpática directa del MLB, sino efectos de la adrenalina circulante, aunque el sistema vascular de la vía aérea sí recibe inervación simpática (Racke´ y col., 2006).

La acetilcolina (Ach) es el principal neurotransmisor encargado de mantener el tono del MLB, actúa a través de los receptores muscarínicos. En los seres humanos, los receptores M1 parecen ser expresados sobre todo en el tejido pulmonar periférico y en la pared alveolar, pero no se han detectado en las grandes vías respiratorias, donde los receptores M2 y M3 representan la principal población de receptores muscarínicos. En condiciones fisiológicas, la contracción del MLB inducida por Ach está mediada principalmente a través de los receptores M3, que se acopla a la vía Gq / PLC / IP3 y DAG / PKC. La liberación de Ach de los nervios parasimpáticos está regulada principalmente por receptores muscarínicos ubicados en los ganglios y en las terminaciones nerviosas pre- y post-ganglionares de las vías respiratorias. En los ganglios de las vías respiratorias se expresan receptores M1 que inhiben la apertura de canales de K<sup>+</sup>, lo que resulta en la despolarización de las células ganglionares parasimpáticas (Coulson y Fryer, 2003). Además, las terminales posganglionares expresan receptores M2 presinápticos que inhiben la liberación de Ach por acoplarse a proteína Gi que activa canales de K<sup>+</sup> e hiperpolariza el axón (Belmonte, 2005). Los antagonistas muscarínicos como bromuro de *ipratropio*

o **tiotropio** inhiben la broncoconstricción generada por Ach al actuar sobre los receptores M<sub>3</sub> presentes en el músculo liso de la vías respiratorias (Ogoda y col., 2011).

El músculo liso bronquial y el bronquiolar, poseen receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos que conducen a broncodilatación por agonistas como la adrenalina o el isoproterenol. El mecanismo efector acoplado es mediante la estimulación de una proteína Gs acoplada a la adenilatociclasa (AC) que aumenta los niveles de AMPc, y por medio de PKA fosforila a la quinasa de la cadena liviana de miosina (KCLM) generando un predominio de la fosfatasa que induce relajación. La expresión de estos receptores es más alta a nivel alveolar (Spina y col., 1989).

Además, existen receptores para histamina (H1) y para eicosanoides como los leucotrienos (LT) que conducen a contracción del árbol bronco-traqueal en estados como alergia o asma. Además, el bronquio asmático o hiperreactivo posee un daño en el epitelio que deja parcialmente expuestas a las terminaciones parasimpáticas. Por ello, el aire frío o el polen desencadenan broncoespasmo con gran facilidad. Se suma el hecho de que estos autacoides (H y LT) aumentan la permeabilidad vascular y la actividad de las glándulas mucosas, lo cual agrava la obstrucción bronquial.

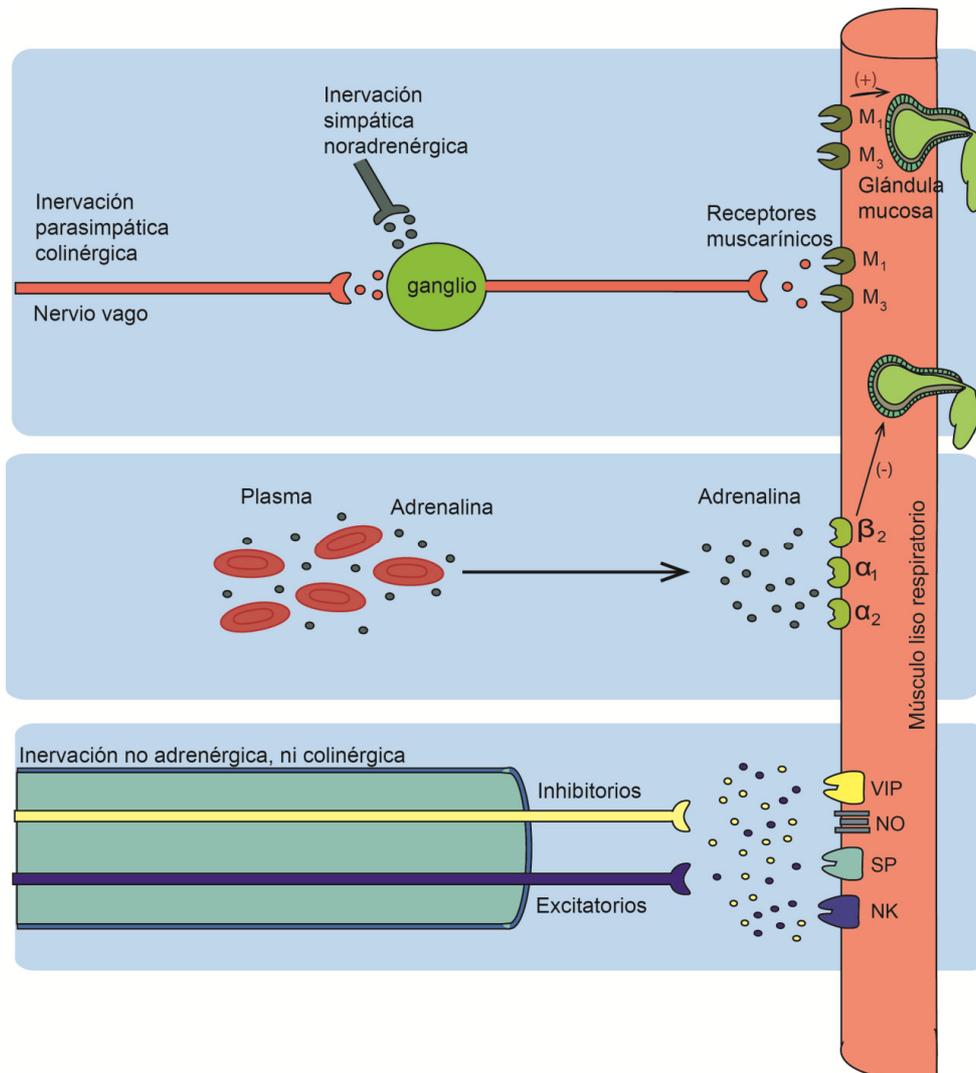


Figura 6. Esquema de la inervación de tráquea y bronquios. Observar las vías colinérgicas, adrenérgicas y de otros neurotransmisores.

## Preparado de tráquea aislada

Para evaluar la actividad farmacológica de diferentes drogas, se utiliza la tráquea de varias especies. Para ello, una vez anestesiado y sacrificado el animal, la tráquea debe ser extraída por disección. La cadena traqueal posee el músculo liso traqueal entre porciones o anillos cartilagosos. Por ello, la tráquea de rata se corta en anillos que se introducen en una cuba con sistema de doble camisa que contiene solución Krebs a 37°C burbujeada con carbógeno (O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%). El anillo se une a un soporte fijo en la parte inferior y a un transductor de fuerza isométrico en la parte superior.

Las respuestas del preparado de anillos de tráquea o bronquio aislados son lentas en inducción y desaparición. Generalmente deben ser pre-contracturados por ejemplo, con Ach o con alta [K]<sup>+</sup> (40 mM) para poder observar el efecto relajante de los agonistas  $\beta_2$  – adrenérgicos (ver figura).

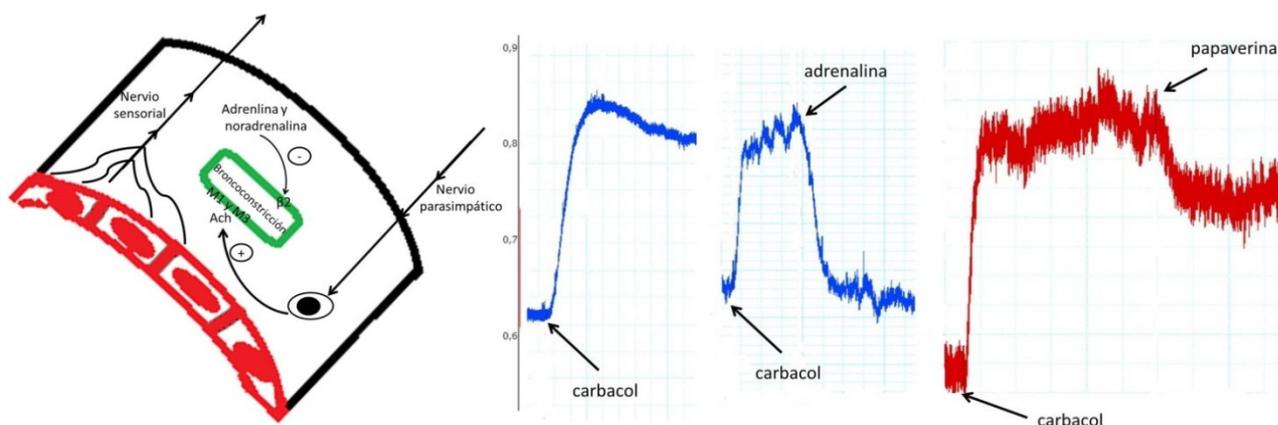


Figura 7. Se observa un esquema de la regulación endógena del tono bronquial (izquierda) y registros experimentales en los que se observan las respuestas de anillos de tráquea aislados expuestos al agregado de carbacol, adrenalina y papaverina.

## Bibliografía

- Aaronson, P. I., Sarwar, U., Gin, S., Rockenbauch, U., Connolly, M., Tillet, A., Watson, S., Liu, B., Tribe, R. M. (2006). A role for voltage-gated, but not Ca<sup>2+</sup>-activated, K<sup>+</sup> channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. *British Journal of Pharmacology* 147(7), 815-824.
- Belmonte, K. E. (2005). Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of American Thoracic Society* 2, 297-312.
- Burnstock, G., Verkhatsky A. (2010). Vas deferens—a model used to establish sympathetic cotransmission. *Trends in Pharmacological Sciences* 31, 131-139.

- Coulson, F. R., Fryer, A. D. (2003). Muscarinic ACh receptors and airway diseases. *Pharmacology and Therapeutics* 98, 59-69.
- Cuprian, A. M., Solanki P., Jackson M. V., y Cunnane T. C. (2005). Cholinergic innervation of the mouse isolated vas deferens. *British Journal of Pharmacology* 146, 927-934.
- Darios, E. S., Seitz, B., Watts, S. W. (2012). Smooth muscle pharmacology in the Isolated virgin and pregnant rat uterus and cervix. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341, 587-596.
- Goodman & Gilman. (2014). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. XII Edición. Mexico, Bogotá, Buenos Aires: Interamericana.
- Hamada, K., Sasaki, Y, Taniguchi, N., Fukui, H., Miyatsuka, Y., Kimura, Y. Ukai, Y., Yoshikuni, Y., Kimura, K. (1997). Anticholinergic and calcium antagonistic activities of NS-21 contribute to the inhibition of rat urinary bladder contractions. *General Pharmacology* 29(5), 771-778.
- Kesler, B.S., Canning, B.J. (1999). Regulation of baseline cholinergic tone in guineapig airway smooth muscle. *Journal of Physiology* 518, 843-855.
- Kitchen, I. (1984). *Textbook of in vitro practical pharmacology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Koslov, D. S., Andersson K. E. (2013). Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens- an update. *Frontiers in Pharmacology* 4,101.
- Ogoda, M., Niiya, R., Koshika, T., Yamade, S. (2011). Comparative characterization of lung muscarinic receptor binding after intratracheal administration of tiotropium, ipratropium and glycopyrrolate. *Journal of Pharmacological Sciences* 115, 374-382.
- Petkov, G.V. (2014). Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology. *American Journal of Physiology- Regulative & Integrative Composed Physiology* 307(6), R571-R584.
- Philyppov, I.B., Golub, A.A., Boldyriev, O.I., Shtefan, N.L., Totska, K., Voitychuk, O.I., Shuba, Y.M. (2016). Myorelaxant action of fluorine-containing pinacidil analog, flocalin, in bladder smooth muscles mediated by inhibition of L-type calcium channels rather than activation of KATP channels. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 389(6), 585-592.
- Smith, R.C., McClure, M.C., Smith, M.A., Abel, P.W., Bradley, M.E. (2007). The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 5, 41 (en: <http://www.rbej.com/content/5/1/41>)
- Racke´, K., Juergens, U.R., Matthiesen, S. (2006). Control by cholinergic mechanisms. *European Journal of Pharmacology* 533, 57-68.
- Spina, D., Rigby, P.J., Paterson, J.W., Goldie, R.G. (1989). Autoradiographic localization of  $\beta$ -adrenoceptors in asthmatic human lung. *American Review of Respiratory Disease* 140, 1410-1415.
- Theobald, J. R. Jr. (1983). The effect of arylazido aminopropionyl ATP on atropine resistant contractions of the cat urinary bladder. *Life Sciences* 32(21): 2479-84.

- Ventura, S. (1998) Autoinhibition, sympathetic cotransmission and biphasic contractile responses to trains of nerve stimulation in the rodent vas deferens. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* 25, 965-973.
- Wallace, A., Gabriel, D., McHale, N. G., Hollywood, M. A., Thornbury, K. D., Sergeant, G. P. (2015). Regulation of nerve-evoked contractions of rabbit vas deferens by acetylcholine. *Physiological Reports* 3, 1-12.
- Xin, W., Li, N., Fernandes, V. S, Chen, B., Rovner, E. S., Petkov, G.V. (2016) BK channel regulation by phosphodiesterase type 1: a novel signaling pathway controlling human detrusor smooth muscle function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 310(10), F994-F999.

## CAPITULO 5

# Farmacodinamia del músculo liso vascular

*Pedro Martín*

### Particularidades de la pared vascular

Los vasos sanguíneos son estructuras altamente reguladas involucradas en el transporte de la sangre, y con ella, los nutrientes y el oxígeno a los tejidos. La pared vascular está compuesta por células endoteliales, células de músculo liso vascular (MLV) y fibroblastos. El diámetro vascular está determinado principalmente por la contracción del MLV y determina el aporte de sangre a cada tejido y la permeabilidad capilar. El grado de contracción del MLV es resultado de la interacción dinámica entre los componentes celulares de la pared vascular (principalmente en endotelio), la innervación autonómica (simpática) y los componentes celulares y humorales que interactúan con el mismo desde la luz vascular.

Patologías como la hipertensión arterial y la insuficiencia cardíaca pueden estar asociadas a un aumento en la contractilidad vascular, que deriva en un aumento en la resistencia periférica. A su vez, en la aterosclerosis existe una reducción en el diámetro de la luz vascular debido a la formación de una placa dentro de las arterias. Por otro lado, los cuadros congestivos a nivel de las mucosas (nasal, conjuntivas, etc.) están asociados a una vasodilatación, con la consecuente extravasación de líquido y proteínas. Esto muestra la modulación farmacológica de la contracción del MLV es una estrategia relevante para lograr el control de estas patologías.

Los mecanismos celulares involucrados en la contracción de las células del MLV son similares a los discutidos en el capítulo 3, donde fueron presentadas las generalidades de la contracción del músculo liso. De esta manera, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma del MLV es fundamental en la determinación de su grado de contracción, siendo esta mayor cuando ocurre un aumento global en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En el caso del MLV dicho aumento se puede producir por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular o a partir de la liberación del mismo desde el retículo sarcoplásmico. Las vías de influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  son numerosas y la importancia relativa de cada una de ellas, así como el peso de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios, varía entre los distintos lechos vasculares. En resumen, un aumento global de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede estar mediada por:

- Activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje (CCVO), de los cuales diferentes subtipos han sido identificados en el músculo liso (L, T, P/Q, R), aunque el tipo L es el principal.

- Activación de canales catiónicos no selectivos (CCNS) permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  que pueden activarse mediante un número importante de estímulos (agonistas, estiramiento mecánico, depleción del retículo sarcoplásmico, estímulos despolarizantes de la membrana celular entre otros).
- Activación de receptores inotrópicos.
- Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico: inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  (vía receptor de rianodina) o por segundos mensajeros (vía receptor de IP3).

El incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y su posterior unión a la calmodulina, desencadena la contracción mediante la activación de la kinasa de la cadena liviana de miosina MLCK, del inglés *miosine light chain kinase*) y la posterior fosforilación de la miosina. El ciclo de la contracción se lleva a cabo hasta que el  $\text{Ca}^{2+}$  vuelve a disminuir a la concentración de reposo al finalizar el estímulo contráctil, donde, el  $\text{Ca}^{2+}$  es removido del citoplasma mediante la extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular y el secuestro de éste hacia los compartimentos intracelulares. La extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  puede realizarse a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  actuando en su modo directo y/o por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa ubicada en la membrana plasmática. Por su parte, la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia los reservorios intracelulares, es mediada por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicada en la membrana del retículo (SERCA, del inglés *sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*), que permite reinstaurar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares de reposo.

## Señales que influyen sobre la actividad del músculo liso vascular

Diversos estímulos endógenos pueden alterar el estado contráctil de las células de MLV actuando sobre las estructuras celulares que intervienen en la regulación de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Como planteamos en el capítulo 3 el control de la contracción de las células del músculo liso depende del potencial de membrana celular ( $E_m$ ) y de la actividad de neurotransmisores autonómicos, y sustancias endócrinas y paracrinas sobre receptores específicos.

Salvo algunas excepciones (como por ejemplo la vena porta), el MLV se caracteriza por carecer de actividad eléctrica espontánea. En general, presentan un potencial de membrana en el reposo que oscila entre -40 y -60 mV. Este valor es mantenido por flujos iónicos a través de canales iónicos de la membrana plasmática en función del gradiente electroquímico y de la permeabilidad de la membrana para cada ion. Se ha demostrado la participación de distintos tipos de canales selectivos al  $\text{K}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  en la regulación y mantenimiento del  $E_m$  en el MLV. Como se mencionará más adelante, diversos estímulos son capaces de modificar el valor del potencial de la membrana por modificar la permeabilidad de la misma a los distintos iones. Estos cambios se observan como corrimientos del  $E_m$  hacia valores más positivos (despolarización) o hacia valores más negativos (hiperpolarizaciones). Existe una vinculación directa entre el valor del  $E_m$  y el estado contráctil del MLV, dado que el mismo regula la activación de los

CCVO, y por lo tanto el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior celular. Por ejemplo, la activación de canales de  $\text{K}^+$  produce hiperpolarización de la membrana celular (y relajación vascular) mientras que su inhibición despolariza la misma, desencadenando la contracción vascular.

Las sustancias que son capaces de modular directa o indirectamente el grado de contracción del MLV se denominan sustancias vasoactivas. Además de aquellas que son capaces de modificar el  $E_m$  del MLV por modificación de la permeabilidad iónica, existen sustancias vasoactivas que modulan la contractilidad muscular actuando sobre sus propios receptores específicos. Existe una gran diversidad de mediadores capaces de modular al MLV (angiotensina II, adrenalina, noradrenalina, histamina, dopamina, ATP, prostaciclina, tromboxano, etc.) sin embargo, la gran mayoría lo hace a partir de activar receptores acoplados a proteína G (Tabla 1). Particularmente, sustancias con actividad vasoconstrictora (como angiotensina II, noradrenalina, tromboxano, entre otras) actúan sobre sus receptores específicos acoplados a proteína Gq que generan la contracción a partir de la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la síntesis de los segundos mensajeros  $\text{IP}_3$  (que estimula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo) y DAG/ PKC (que fosforila y activa a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, aumentando el influjo por estos canales). Por su parte, la mayoría de las actividades vasorrelajantes mediadas por receptor (por ejemplo: prostaciclina, histamina) son llevadas a cabo por la activación de receptores acoplados a proteína Gs, que gracias a un incremento en los niveles de AMPc deriva en la inactivación de la MLCK por fosforilación de la misma por la PKA. Esta kinasa además puede provocar la hiperpolarización del músculo liso al activar canales de  $\text{K}^+$ , lo que deriva en un menor influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En la siguiente tabla se presentan los principales receptores que median la contracción y relajación del MLV:

**Tabla 1: Sustancias endógenas vasoactivas y sus receptores presentes en las células de músculo liso vascular.**

Efecto	Tipo de receptor	Sustancia	Denominación del receptor
Vasoconstricción	Acoplado a proteína Gq	Adrenalina / noradrenalina	$\alpha_1$
		Angiotensina II	$\text{AT}_1$
		Serotonina (5-HT)	5-HT <sub>2</sub>
		Acetilcolina <sup>1</sup>	M <sub>3</sub>
		Endotelina	ET <sub>A</sub> y ET <sub>B</sub>
		Tromboxano (TXA <sub>2</sub> )	TP
	Receptor ionotrópico: canal catiónico no selectivo	ATP	P2X
	Activación de canales de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L vía ROC.	Adrenalina / noradrenalina	$\alpha_2$
Vasorrelajación	Acoplado a proteína Gs	Adrenalina	$\beta_2$
		Histamina <sup>2</sup>	H <sub>2</sub>
		Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> )	IP

1 En presencia del endotelio intacto el efecto neto de la Acetilcolina es relajación (ver más abajo).

2 La histamina también genera vasodilatación por su actividad a nivel endotelial (ver más abajo).

## Principales sistemas de regulación del tono vascular

El aparato circulatorio es un sistema con múltiples regulaciones. Desde el punto de vista farmacológico haremos hincapié en el control autonómico, en el sistema renina-angiotensina-aldosterona y en la relación con otros tipos celulares como el endotelio, células sanguíneas y del sistema inmune.

### Control autonómico

El sistema nervioso autónomo participa de la regulación del tono vascular mediante la actividad exclusiva de sistema nervioso simpático. La liberación de noradrenalina desde terminales simpáticas lleva a una vasoconstricción mediada por la activación de receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . Cabe destacar que la noradrenalina presenta menor actividad en los receptores  $\beta_2$ , los cuales se hallan principalmente expresados en el MLV de los vasos que irrigan el músculo esquelético, corazón y el sistema nervioso central. De esta manera, genera a un aumento de la contracción en la mayoría de los lechos vasculares. Por otro lado, la liberación de adrenalina por la médula suprarrenal también tiene efectos en el aparato circulatorio, sin embargo la actividad de la adrenalina sobre los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos es 10-50 veces mayor respecto a la noradrenalina, lo que implica la misma será capaz de contraer los lechos vasculares que carecen de este receptor y de relajar aquellos que sí lo expresan. Esta diferencia es esencial para explicar la redistribución del volumen sistólico ante una situación de ejercicio o *stress*.

### Sistema renina-angiotensina-aldosterona

El sistema renina-angiotensina-aldosterona actúa en sinergia con el sistema nervioso simpático, promoviendo a una mayor vasoconstricción y a la retención de  $\text{Na}^+$  y agua a nivel renal. Puntualmente, a nivel del músculo liso, la angiotensina II, formada a partir de la angiotensina I mediante la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), constituye uno de los agentes vasoconstrictores más potentes de la fisiología humana.

### El endotelio vascular como principal co-participante de la regulación del tono vascular

El endotelio vascular está formado por una monocapa de células que recubren la superficie luminal de todos los vasos sanguíneos y posee un rol fundamental en la homeostasis cardiovascular. Las células endoteliales (CE) no solo constituyen una barrera entre el plasma y el líquido extracelular, sino sintetizan y liberan una serie de factores que regulan la permeabilidad y el tono contráctil de los vasos sanguíneos así como también la angiogénesis y las respuestas inflamatorias, entre otros fenómenos vasculares. Su participación en el balance entre vaso-

constricción y vasodilatación es fundamental para la función vascular, de manera que las alteraciones endoteliales pueden desbalancear este equilibrio y desencadenar diversas patologías como diabetes e hipertensión arterial.

Las CE pueden liberar mediadores vasoactivos en respuesta a distintos estímulos fisiológicos como pueden ser sustancias circulantes (como serotonina, angiotensina II, adrenalina, bradiquinina), sustancias liberadas por las plaquetas o por las células del sistema inmune, neurotransmisores liberados por las terminales nerviosas, cambios en la presión de O<sub>2</sub> sanguínea, alteraciones ácido base, así como cambios en el flujo sanguíneo que generan una fuerza de roce (del inglés, *shear stress*) sobre la superficie celular. Los factores liberados por el mismo pueden difundir y actuar sobre las células de MLV produciendo la contracción o la relajación, y por lo tanto modificando el diámetro de la luz del vaso.

Dentro de los factores vasoconstríctiles dependientes de endotelio, el más estudiado es la endotelina, la cual es liberada por el endotelio ante traumatismos, inflamación, activación de las plaquetas, hipoxia, entre otros estímulos. Como se observa en la tabla 1 la contracción se genera a partir de la unión a sus receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> presentes en el MLV.

En contraste con la poca diversidad de factores vasoconstrictores, existe una mayor diversidad de factores vasodilatadores dependientes de endotelio. Puntualmente, los más estudiados e implicados en la farmacología vascular son el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), los cuales son liberados por el endotelio ante el estímulo de un agonista, o por la acción de un estímulo mecánico (*shear stress*) sobre las CE. Sin embargo, en una gran cantidad de vasos sanguíneos las repuestas endoteliales no pueden ser explicadas completamente por estos dos mediadores, dado que al inhibir su síntesis (vía NOS y COX, con L-NAME e indometacina, respectivamente) la respuesta vasodilatadora persiste. Debido a que esta respuesta vasorrelajante, mediada por endotelio e independiente de NO y de PGI<sub>2</sub>, se caracteriza por la hiperpolarización del MLV, se la denominó genéricamente con el nombre de vasodilatación inducida por el Factor Hiperpolarizante Dependiente de Endotelio (EDHF, de la sigla en inglés *endothelium dependent hiperpolarizing factor*). Actualmente se acepta la existencia de más un mediador que cumple con esta condición. El peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y otros gases como el monóxido de carbono (CO) y el ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), el péptido natriurético atrial de tipo C (PNA-C), los endocannabinoides, y el ácido araquidónico (AA) y sus metabolitos (sintetizados por la lipoxigenasa (LOX) y el citocromo P450), por citar los más estudiados, son propuestos como posibles EDHF. Si bien son numerosas las sustancias que se proponen como EDHF, en distintos lechos vasculares de distintas especies, las mismas tienen como factor común un mecanismo de acción hiperpolarizante que involucra la activación de canales de K<sup>+</sup>. La hiperpolarización generada por estos factores lleva a la relajación del MLV, ya que disminuye la actividad de los CCVO presentes en las CMLV, produciendo una disminución de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular y por lo tanto la relajación del músculo liso. En la figura 1 se resumen los mecanismos por los cuales el endotelio puede mediar la relajación muscular

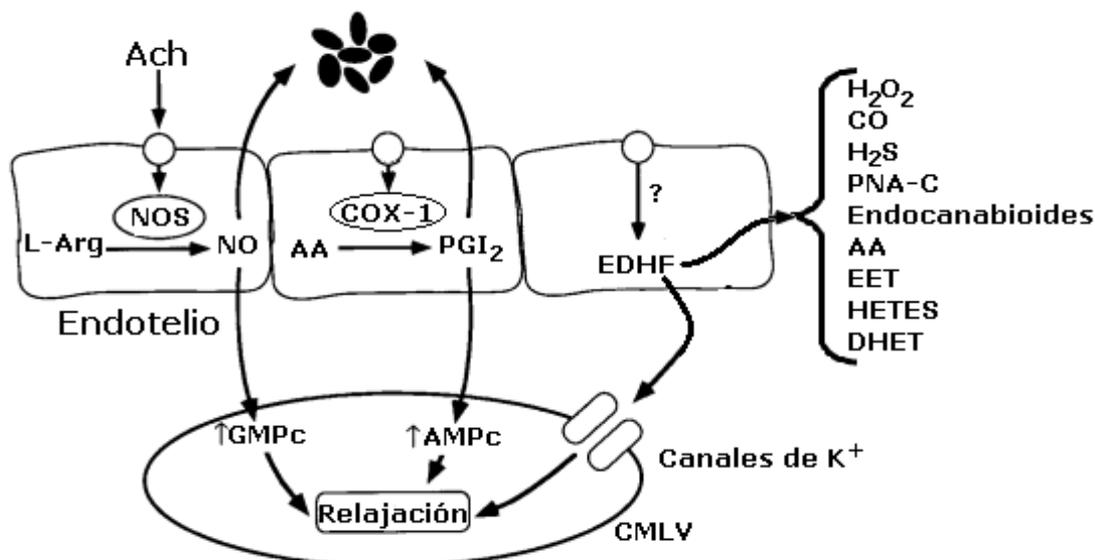


Figura 1: Esquema de las vías principales de la relajación del MLV dependiente de endotelio. La activación de las células endoteliales puede inducir a la liberación del óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y diversos EDHF (derivados o no del AA), que desencadenan la relajación de las CMLV. El NO es sintetizado por las óxido-nítrico sintasa (NOS) y la PGI<sub>2</sub> a partir de la ciclooxigenasa-1 (COX-1).

El NO es un potente agente vasodilatador, que además, inhibe la agregación plaquetaria, la inflamación vascular y la proliferación de las células de MLV. Existen tres isoformas de la enzima que sintetiza NO, la NOS (I, II y III; neuronal, inducible y endotelial, respectivamente). A nivel vascular tiene mayor relevancia la endotelial (eNOS), la cual es responsable de la producción de NO en estos tejidos. Esta enzima se activa cuando hay un incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en las CE. El mismo puede ser generado por la activación de receptores acoplados a proteína Gq como por ejemplo los de histamina de tipo H<sub>1</sub> y los de acetilcolina de tipo M1. El NO es reconocido como el factor endotelial de mayor importancia en la regulación de la función vascular. Sus acciones son mediadas por la activación de la guanilato ciclasa (GC) soluble del MLV, generando el respectivo aumento en la concentración de GMPc, que lleva directa o indirectamente (vía fosforilación por una proteína quinasa G (PKG)) a la hiperpolarización de las células de MLV, mediante la activación de canales de K<sup>+</sup>. Además, la PKG es capaz de inhibir la actividad de la fosfodiesterasa (PDE), que lleva a un aumento en los niveles del GMPc y del AMPc, sumado a su capacidad de inhibir a las MLCK y de activar a la fosfatasa de la MLC, promoviendo la relajación de las células de MLV.

El principal metabolito del AA generado a partir de la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX) en las CE e involucrado como factor endotelial es la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). La misma actúa sobre los receptores denominados IP generando antiagregación plaquetaria y vasodilatación. Este último efecto lo logra mediante la hiperpolarización del MLV y la menor actividad de la MLCK secundarias a un incremento en los niveles de AMPc. Se ha observado en general que la contribución de la PGI<sub>2</sub> es importante especialmente como respuesta al estímulo mecá-

nico a nivel endotelial (*shear stress*), mientras que posee poca relevancia en la actividad endotelial inducida por agonistas.

### **Otras regulaciones**

Existen además muchas regulaciones del tono vascular, pero en esta sección vamos destacar 2 de relevantes dentro de la farmacología utilizada actualmente en la clínica. Por un lado, las plaquetas son capaces de modular la contractilidad vascular. La activación de las plaquetas suele inducir a la síntesis y liberación de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), un metabolito derivado de la acción de la COX sobre el ácido araquidónico. El TXA<sub>2</sub> es un potente vasoconstrictor al actuar en el MLV sobre sus receptores TP acoplados a proteína Gq. Además este mediador promueve la agregación plaquetaria. Integrando sus efectos con los descritos para la PGI<sub>2</sub> de origen endotelial, se desprende que el control de la contracción y la agregación plaquetaria dependerán del balance entre estos dos metabolitos, y por lo tanto de las señales que reciban las CE y las plaquetas.

Por otro lado, en las secciones anteriores destacamos que la histamina es un potente vasodilatador. Esto se debe a sus efectos directos en el MLV (vía receptores H<sub>2</sub>), como a los indirectos por la estimulación de la síntesis de NO a nivel endotelial (vía receptores H<sub>1</sub>). Es importante destacar aquí que la liberación de histamina desde distintos granulocitos es un proceso temprano en la respuesta inmunológica innata, y por lo tanto la vasodilatación inducida por este mediador está presente en la mayoría de las respuestas inflamatorias. Este fenómeno también se encuentra presente en las respuestas de hipersensibilidad de tipo I, a partir de la liberación de Histamina desde los mastocitos, y es responsable de edema y la congestión principalmente nasal y conjuntival de pacientes alérgicos.

## **Fármacos de uso clínico con actividad sobre el músculo liso vascular**

Múltiples patologías pueden ser tratadas con fármacos que alteran la contractilidad del MLV. Fármacos con actividad vasodilatadora son utilizados para el tratamiento de la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca congestiva y la angina de pecho. El eje renina-angiotensina-aldosterona es modificado farmacológicamente a múltiples niveles. Los antagonistas del receptor de angiotensina II de tipo AT<sub>1</sub> (ARA II), como el losartán y el candesartán, actúan inhibiendo la actividad de la misma directamente en el MLV, mientras que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs, como el enalapril) y los antagonistas β-adrenérgicos (por ejemplo: atenolol (β1-selectivo) y propranolol (no selectivo) reducen la actividad del eje por disminuir la síntesis de angiotensina II a partir de angiotensina I y disminuir la liberación de renina desde el aparato yuxtglomerular, respectivamente. De la misma manera, el control simpático puede ser regulado con el fin de disminuir la contractilidad vascular mediante la acción directa en el músculo por bloqueo de los receptores α-adrenérgicos o por una disminución

de la descarga simpática por la activación de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos del sistema nervioso central (por ejemplo: clonidina). Puntualmente el bloqueo puro de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, como el que pueden hacer el prazosin y la terazosina, no está actualmente recomendado en patologías vasculares, sin embargo si se encuentra en uso clínico fármacos como el carvedilol que presenta un bloqueo en receptores  $\alpha_1$ - y  $\beta$ -adrenérgicos.

También se encuentran en uso clínico agentes vasodilatadores que directamente actúan a nivel del músculo liso sin actuar a nivel de receptores. Bloqueantes de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L como las dihidropiridinas (nifedipina, amlodipina, etc.), abridores de canales de  $\text{K}^+$  (como el minoxidil y la hidralazina) e inhibidores de la fosfodiesterasa (por ejemplo: sildenafil, teofilina, etc.) pueden inducir a una vasodilatación por acción directa en el músculo liso vascular. Además, en el caso particular de la angina de pecho, el aporte de oxígeno a nivel miocárdico puede ser incrementado por la inducción de la vasodilatación coronaria por fármacos liberadores de NO; como la nitroglicerina, el dinitrato de isosorbide, 5-mononitrato de isosorbide y el nitroprusiato de sodio; que inducen la activación de la GC a nivel del MLV.

Por otra parte, existen fármacos que se utilizan para el tratamiento sintomático de la congestión por inducir a la vasoconstricción o por prevenir la vasodilatación inducida por histamina en cuadros alérgicos. Fenilefrina, nafazolina, oximetazolina, entre otras actúan estimulando a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos para inducir la contracción vascular y la consecuente reducción en la extravasación de líquido. La pseudoefedrina presenta el mismo efecto in vivo, pero a partir de promover la liberación de noradrenalina desde las terminales simpáticas. El bloqueo de receptores de histamina de tipo  $\text{H}_1$  a nivel endotelial por antihistamínicos de primera generación (difenhidramina, clorfenhidramina) y de segunda generación (loratadina, ceterizina, desloratadina), se utiliza prevenir la aparición de la sintomatología alérgica.

## **Aproximación experimental para el estudio del músculo liso vascular**

Experimentalmente, se utilizan anillos de los vasos como aorta, mesentérica, coronaria, vena safena, o de otros vaso, para medir la contracción del músculo circular la cual es censada por una transductor de fuerza. Este preparado cuenta con la limitante que la luz de los vasos debe ser lo suficientemente grande para introducir los alambres que se conectan al transductor sin dañar al endotelio. Otro preparado que permite una medida de mayor calidad de las arterias de resistencia de bajo calibre, consiste en la medición de la presión de perfusión de lechos vasculares completos (como el mesentérico). Aquí se canula la arteria mesentérica y por ella se perfunde con un flujo constante y se mide la presión necesaria para mantener dicho flujo, los cambios de la presión reflejan directamente cambios del tono contráctil. Otra ventaja de este preparado es la situación "in situ" de que el tejido aislado puede contener la inervación autonómica, permitiendo detectar efectos de fármacos a nivel de la maquinaria del neurotransmisor.

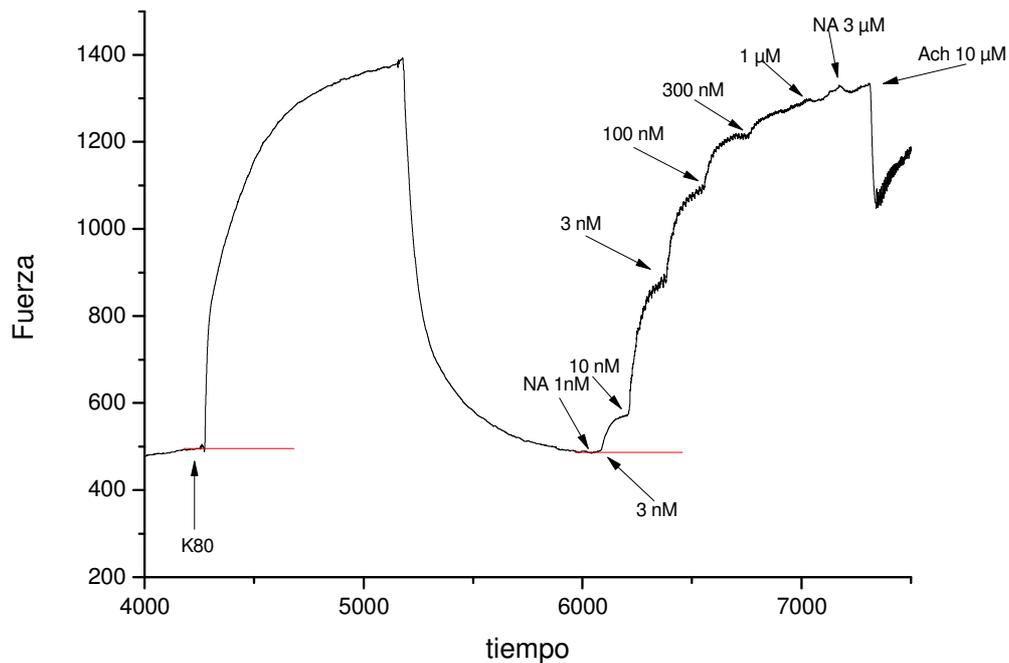


Figura 2. Registro de fuerza de contracción isométrica de un anillo de aorta de rata expuesto un incremento en la concentración de K<sup>+</sup> (80 mM). Luego del lavado se observa el agregado de concentraciones crecientes de NA y sobre esta contracción se observa la relajación mediada por endotelio tras el agregado de acetilcolina.

## Bibliografía

- Allen, B. G., Walsh, M. P. (1994). The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends in Biochemical Sciences* 19, 362-368.
- Amberg, G. C., Navedo, M. F. (2013) Calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Microcirculation*. 20(4), 281-9.
- Brozovich, F. V., Nicholson, C. J., Degen, C. V., Gao, Y. Z., Aggarwal, M., Morgan, K. G. (2016). Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacology Review* 68(2), 476-532.
- Feletou, M., Vanhoutte, P. (2009). EDHF: an update. *Clinical Sciences (Lond)* 117, 139-155.
- Jiang, H., Stephens, N. L. (1994) Calcium and smooth muscle contraction. *Molecular and Cellular Biochemistry* 135, 1-9.
- Nelson M. T., Quayle J. M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology* 268, C799-822.

## **Bibliografía ampliatoria**

Kitchen, I. (1984). *Textbook of in vitro practical pharmacology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Goodman & Gilman. (2014) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. XII Edición. Buenos Aires: Interamericana.

# CAPITULO 6

## Interacción fármaco-receptor y farmacodinamia cuantitativa

*Alicia E. Consolini*

*... porque ni el libro ni la arena tienen ni principio ni fin.*

JORGE LUIS BORGES, el libro de arena

### Teoría de receptores

#### A. Agonistas y antagonistas

En la Presentación y Generalidades del libro hemos planteado los conceptos de agonista y de un tipo de antagonista, el competitivo. Recordemos que un **agonista** es un compuesto con capacidad para estimular a un receptor con cierta **afinidad** y provocar un cambio conformacional en el receptor que conduce a un efecto observable por tener una capacidad denominada **actividad intrínseca o eficacia**. En cambio, un **antagonista competitivo** es un compuesto que tiene afinidad por un receptor pero carece de esta capacidad de estimular una vía celular asociada al receptor.

Retomamos ahora estos conceptos para analizar la Farmacología cuantitativa.

#### B. Diferentes tipos de antagonismo

Cualquier fármaco que se oponga a la acción de un agonista puede denominarse antagonista; pero según su modo de acción los efectos de antagonistas pueden clasificarse como:

##### **1 -Antagonismo químico:**

Se produce por la interacción química con el agonista, que generalmente le provoca una pérdida de su efectividad. Ej.: la protamina con carácter básico fuerte se combina con la heparina, un ácido fuerte para formar una sal estable, tal que la actividad anticoagulante de la heparina se pierde. Esto se aprovecha para emplear a la protamina como un antídoto contra la excesiva acción de medicamentos anticoagulantes.

## **2- Antagonismo competitivo:**

Es el descrito anteriormente, donde el agonista y el antagonista compiten por los mismos receptores, por los cuales ambos tienen afinidad. Por ejemplo, atropina respecto del receptor muscarínico de acetilcolina.

## **3- Antagonismo no competitivo:**

Aquí el antagonista interactúa con sus propios receptores, diferentes de los del agonista, y como consecuencia se produce un cambio en la relación concentración - efecto del agonista. Podemos subdividirlos en:

3.1 - Antagonismo metafinoide: la interacción con los receptores del antagonista produce una reducción de la afinidad del agonista hacia sus propios receptores (poco frecuente)

3.2 - Antagonismo metactioide: la interacción con los receptores del antagonista produce una interferencia en la capacidad de desarrollo de efecto del agonista (reduce el efecto en un mismo grado a las diversas concentraciones del agonista) (es el más frecuente). Por ejemplo, un antagonista de los canales de  $Ca^{2+}$  como nifedipina puede reducir la contractilidad provocada por carbacol en la vejiga urinaria.

## **4- Antagonismo funcional:**

Se produce cuando los agonistas interactúan con dos sistemas receptores independientes, causando efectos contrarios y estos efectos son producidos en el mismo sistema efector. Por ejemplo, la acetilcolina al interactuar con sus receptores en el duodeno de rata lo contrae, mientras la adrenalina por el contrario lo relaja. Ambas interactúan con sus propios receptores en el mismo sistema efector (cascadas de contracción del músculo liso).

**5- Antagonismo físico:** dos drogas actúan sobre sistemas receptor-efector independientes y los efectos resultantes se contraponen. Por ejemplo, un fármaco puede reducir la presión arterial por generar vasodilatación directa (amlodipina) mientras otro fármaco puede incrementar la presión sanguínea aumentando la volemia por retención renal de sodio (antiinflamatorio no esteroideo).

## **C- De la administración al efecto**

Los experimentos en órganos aislados permiten conocer sobre qué tipo de receptor actúa un compuesto químico, y esto permite clasificar a los fármacos en familias. Una familia de fármacos interactuará con el mismo sistema receptor produciendo la misma clase de efectos, por lo cual será útil comparar sus respectivas propiedades de interacción droga-receptor, tales como la **afinidad** y la **eficacia intrínseca**.

Esta clasificación en familias es útil en los estudios de relación estructura química-actividad biológica, en los que el conocimiento de las secuencias o relaciones de **afinidad y actividad intrínsecas de agonistas** y de **afinidad de antagonistas** se evalúan para cotejarlas con los

cambios de estructura química, asociándolos a determinados sustituyentes. La comparación de estos parámetros biológicos que permiten cuantificar la actividad de una droga con otros parámetros fisicoquímicos (por ejemplo indicadores de lipofilia y otras propiedades) es una herramienta valiosa para diseñar nuevos fármacos (tema tratado en Química Medicinal).

Para determinar las magnitudes antedichas primero deberíamos conocer **qué relación existe entre la concentración de fármaco en la vecindad de los receptores y el cambio producido en ellos**. Sin embargo, lo que experimentalmente podemos determinar es la **relación entre la dosis administrada y el efecto medido**, ¿es posible deducir la primera relación de la segunda?

Cuando una dosis de un cierto fármaco es administrada a un paciente o a un animal de experimentación, la cadena de eventos que llevan al efecto final consiste de tres partes principales, con características diferentes:

(a) Al administrar el fármaco se obtiene una cierta **concentración en la biofase**, o sea en la vecindad directa de los receptores o compartimento en el cual tiene lugar la interacción fármaco-receptor. Esta concentración depende de la cantidad de droga administrada y de otros factores, algunos conocidos y otros no, como la vía de administración, la localización de los receptores en el organismo, la cantidad de receptores silenciosos para esta droga, propiedades fisicoquímicas de la droga como tensión superficial, coeficiente de partición lípido-agua, relación de forma disociada a forma no disociada al pH fisiológico, metabolismo de la droga, etc.

(b) La presencia del fármaco en la biofase lleva a la **interacción entre las moléculas del fármaco y los receptores**. Esa interacción es reversible y depende de fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno u otro tipo de interacción lábil entre ciertas zonas de la molécula de droga y el receptor (regiones de una macromolécula expuesta en la membrana celular generalmente de tipo glicoproteína, o proteínas citosólicas llamadas chaperonas con afinidad por los ácidos nucleicos, típicos de la acción de hormonas. Si la droga es un agonista se producirá un cierto cambio conformacional a nivel del receptor que activará una vía de transducción de la señal a nivel intracelular o a nivel del genoma, respectivamente. La magnitud del cambio depende de la concentración de droga en la biofase, de la **afinidad** hacia los receptores y de la **actividad intrínseca**.

El resultado de la interacción fármaco-receptor es la formación de un estímulo. Si bien este punto se abordará más adelante, el estímulo es una propiedad abstracta que refleja la cascada de eventos celulares disparada por la activación del receptor. El carácter de la **relación estímulo-efecto** puede depender también, de cuál fenómeno es elegido como "efecto". Así, en el caso de un espasmógeno el efecto podría ser la contracción muscular, la despolarización de la membrana, el flujo de Na<sup>+</sup>, el flujo de K<sup>+</sup>, etc., generalmente dependiendo del tejido en el cual se lo estudia y de la magnitud que se evalúa para medir el efecto. Una vez producido el estímulo, los procesos ya no dependen del fármaco, puesto que **un cierto estímulo produce siempre el mismo efecto**. Dos fármacos diferentes y a diferente concentración pueden producir el mismo efecto porque a nivel del mismo receptor desarrollan el mismo estímulo (similar grado de activación de las vías de señalización hasta llegar al efecto).

Entonces, para estudiar la interacción a nivel del receptor deberíamos conocer dos variables exactamente: la concentración en la biofase y el efecto provocado sólo por el fármaco. Sin embargo, si el efecto se midiera *in vivo*, en lugar de esas variables conoceremos la dosis administrada (expuesta a etapas farmacocinéticas hasta llegar a la biofase) y un efecto en el que hay influencia de otros factores del organismo (tales como efectos reflejos y otras compensaciones). Esto genera la necesidad de que para estudiar los parámetros de la interacción fármaco-receptor, se deban emplear sistemas *ex vivo* (preparados de tejidos aislados) o sistemas *in vitro* (células en cultivo o moléculas aisladas). En ambos casos, se puede conocer con exactitud la concentración de fármaco en el medio que baña al sistema (asumible como la biofase) y medir un efecto que resulte solo dependiente de la concentración del fármaco.

## D. Cuantificación de las respuestas de tejidos aislados a agonistas

El tejido aislado (*ex vivo*) puede ser utilizado efectivamente para obtener información acerca de los fármacos y de los receptores de una manera que trasciende las especies y la función. Esta información es valiosa en la definición del mecanismo de acción de nuevos fármacos y del diseño de más efectivos agentes terapéuticos para el hombre. Por otra parte, también permite identificar tipos de receptores presentes en un determinado tejido, lo cual permite comprender mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos.

Así, el proceso de clasificación de fármacos y de receptores tiene una naturaleza esencialmente circular: nuevos tipos o subtipos de receptores son descubiertos solo después del descubrimiento de nuevas drogas selectivas. Luego, nuevas drogas (posibles fármacos) son clasificadas por su interacción con estos nuevos receptores.

Este proceso de clasificación requiere la determinación de parámetros característicos de la interacción droga-receptor e independientes del tejido. Estos son los **parámetros de afinidad y de actividad o eficacia intrínseca**.

### Curvas concentración-respuesta

Para obtener los parámetros de interacción fármaco-receptor se realiza un barrido de los efectos producidos por un rango amplio de concentraciones del fármaco en cuestión. Para ello, se construyen las curvas concentración-respuesta (CCR). Para facilitar la caracterización del efecto de un fármaco se pueden esencialmente describir tres parámetros de la CCR: un efecto máximo ( $E_{max}$ ) en el eje de las ordenadas, un parámetro de localización en la abscisa o eje de concentración (concentración efectiva al 50% del  $E_{max}$  o CE50) y una pendiente. Estos parámetros son descriptivos, y aun cuando comparemos la interacción del mismo fármaco con el mismo tipo de receptor pero en diferentes tejidos, habrá diferencias en la CE50 y quizás también en el  $E_{max}$ . Por ejemplo las CE50 de acetilcolina (ACh) frente al receptor muscarínico (M) diferirán entre el intestino, la vejiga, y el útero, entre otros. Esencialmente los tejidos difieren en la amplificación de la señal de transducción entre la activación del receptor y la generación del efecto, como se discutirá más adelante. Por lo tanto, la

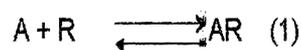
información sobre las constantes que caracterizan la interacción fármaco-receptor (afinidad y eficacia intrínseca) no pueden obtenerse directamente de la CCR.

Además, debido a que muchos factores vinculados al tejido afectan estos parámetros se puede producir una disparidad entre la concentración de agonista agregada al medio nutriente del órgano aislado y la que existe en la vecindad del receptor (biofase) estando ambas en un equilibrio de difusión. En el experimento de CCR el agonista no debe ser alterado por degradación química (ej. oxidación de catecolaminas, por degradación enzimática, recaptación o liberación simultánea de sustancias endógenas). Otras fuentes de error son la desensibilización de receptores por el tiempo o por la frecuencia de exposición a un agonista (formas de tolerancia), o los cambios de sensibilidad tisular según el tono muscular espontáneo del tejido. Para evitar estas alteraciones deben tomarse cuidados de estabilización, correcta administración y prevención de reacciones o transportes que alteren la concentración en la biofase al trabajar con el tejido aislado. Para adjudicar los efectos a la interacción droga-receptor debe asumirse que:

1. la respuesta del tejido aislado surge exclusivamente del agonista agregado
2. la concentración en la biofase es igual a la agregada al medio (o perfundida)
3. las respuestas del tejido son un resultado directo de la interacción droga-receptor
4. estas respuestas no son modificadas en forma impredecible por el tejido ni por otro factor.

## Evolución de las teorías de interacción fármaco - receptor

En la época en que se comenzó a pensar cómo actuaban los fármacos estaba en auge la Química como ciencia que había avanzado en forma importante, mientras que la biología apenas comenzaba a conocerse. Es importante recordar que la Farmacología fue una ciencia biológica pionera porque el empleo de fármacos (de origen natural inicialmente y luego de síntesis) ha permitido conocer mecanismos fisiológicos y vías participantes por ser una herramienta que evidenciaba origen de efectos al inhibirlos o estimularlos. Por ello, las primeras teorías de cómo un fármaco interactuaba con una "parte del organismo" (denominada receptor aún sin conocer su estructura) para generar un efecto se pensaron como un equilibrio químico. Así, Clark en 1937 empleó la ley de acción de masas para describir el enlace reversible de una droga al receptor:



De donde:

$$K_A = \frac{[R] \cdot [A]}{[RA]} \quad (2)$$

$K_A$  : constante de disociación del complejo fármaco-receptor.

[A]: concentración de fármaco agonista

Rt: número total de receptores

RA: número de receptores ocupados por el fármaco A

R: número de receptores libres

Si consideramos:  $R_t = [R] + [RA] \rightarrow [R] = [R_t] - [RA]$   
 Resulta:

$$K_A = \frac{(R_t - [RA]) \cdot [A]}{[RA]}$$

Y la fracción de receptores ocupados ( $[RA]/R_t$ ) resulta:

$$\frac{[RA]}{R_t} = \frac{1}{1 + \frac{K_A}{[A]}} = \frac{[A]}{[A] + K_A}$$

Esta ecuación asume que cada molécula de droga se enlaza a un único sitio en un receptor. Si consideramos la ocupación del 50% de receptores  $[RA]/R_t = 1/2$  y resulta  $K_A = [A]_{50\%}$ .

O sea, se define que la constante de disociación  $K_A$  es la concentración de fármaco que ocupa el 50% de los receptores totales.

La inversa de la constante de disociación ( $1/K_A$ ) representa la tendencia a unirse al receptor, o sea que es **un parámetro de la afinidad de A por R**. Su valor es independiente de los distintos tejidos y especies animales en los cuales se lo determine. Puede estimarse a partir de estudios de "*binding*" (unión) de fármaco marcado radioactivamente a receptores del tejido.

Las teorías de ocupación asumen que la ocupación de un receptor por una droga conduce a un estímulo y subsecuente respuesta. Clark asumió la proporcionalidad o linealidad entre la fracción de receptores ocupados y el efecto observado, pero esto habría de ser refutado por experimentos posteriores.

El concepto del agonista puro y parcial fue introducido por Ariens en la forma de una constante de proporcionalidad que denominó "**actividad intrínseca**" ( $\alpha$ ).

$$\frac{E_A}{E_{\max}} = \frac{\alpha [A]}{[A] + K_A}$$

Donde  $E_{\max}$  es el efecto máximo del tejido debido a activación del mismo receptor, y  $K_A$  es la constante de disociación

Clark y Ariens establecían que el efecto era directamente proporcional a la fracción de receptores ocupados obteniéndose el efecto máximo con la ocupación de los  $R_t$ . Sin embargo, experimentos en los que se reducía la cantidad de receptores por medio de un antagonista irreversible (Nickerson, 1947) mostraron que los agonistas, especialmente, los puros alcanzaban igualmente el efecto máximo del tejido (ver luego).

En 1956, Stephenson modificó la teoría estableciendo que la ocupación de receptores genera un **estímulo (S)** directamente proporcional al número de receptores ocupados. El efecto es, entonces, una función definida del estímulo:

$$\frac{E_A}{E_{A \max}} = f\left(\frac{S_A}{S_{A \max}}\right)$$

Entonces, una misma respuesta en un tejido dado puede ser producida por distintas concentraciones de dos agonistas si ambos producen iguales estímulos, a pesar de sus diferentes grados de ocupación del receptor. El parámetro que relaciona el estímulo al grado de ocupación fue denominado "**eficacia**" (**e**) y representa la capacidad de la droga para producir un estímulo.

$$\frac{E_A}{E_{MX}} = f \frac{e \cdot [A]}{[A] + K_A} \quad E_A/E_{Amax} = f \cdot S_A/S_{Amax}, \text{ y } S_A = e \cdot [RA]/Rt$$

Esta función representa una **relación no lineal entre el estímulo (S) y la respuesta (E)**. Las constantes f y e son desconocidas y dependientes del tejido. La función hiperbólica resultante de E versus [A] permite estimar que la respuesta máxima ( $E_{max}$ ) podrá obtenerse con la ocupación de un número inferior al de los receptores totales (alcanzado asintóticamente).

La eficacia (e) es un término dependiente del fármaco y del tejido. Entonces, **Furchgott** modificó este modelo para diferenciar en ese término a los factores dependientes del fármaco (la eficacia intrínseca  $\epsilon$  y la afinidad  $K_A$ ) y los factores dependientes del tejido (la función f y el número de receptores totales  $Rt$ ), y definió a la eficacia e como el producto de la **eficacia intrínseca ( $\epsilon$ )** y el número de receptores totales.

Así, la **eficacia intrínseca  $\epsilon$**  es una constante del par fármaco – receptor, y es independiente de los distintos tejidos y especies animales en los cuales se lo determine, y representa la **capacidad del agonista de generar un efecto por estimulación del receptor**, siendo esto independiente de la afinidad por ese receptor.

Es importante diferenciar **las 2 propiedades básicas de un agonista:**

- **Afinidad (expresada como  $1/K_A$  o  $-\log K_A$ ):** capacidad de unirse reversiblemente al receptor, depende de la relación estructura-actividad y se mide en términos de concentración.
- **Eficacia intrínseca (expresada como relativa  $\epsilon_A/\epsilon_B$ ):** capacidad de generar un estímulo (S) y un efecto E una vez que activó al receptor

Entonces la función que expresa al efecto del agonista A con respecto al efecto máximo del tejido resulta:

$$\frac{E_A}{E_{max}} = f \left( \frac{\epsilon_A [Rt] [A]}{[A] + K_A} \right) \quad (\text{Ec 1})$$

donde se distinguen **factores relacionados al fármaco ( $K_A$  y  $\epsilon_A$ )** y factores relacionados al **tejido:**

- a) **f**, la función que acopla el estímulo (S) con la respuesta (E) y depende de la amplificación de la señal de transducción celular entre el receptor y el efecto,
- b) **[Rt]**, la concentración de receptores totales, ya que cuando más receptores hay en un tejido mayor sería el efecto de un agonista.

Los factores relacionados a la **interacción droga-receptor** son: **a) la afinidad ( $1/K_A$ ), y b) la **eficacia intrínseca  $\epsilon_A$** . Para estimar estos últimos parámetros a partir de las CCR se comparan iguales efectos para cancelar los factores tisulares. Esta comparación se basa en que efectos iguales provienen de iguales estímulos y por lo tanto permiten la comparación de las fracciones de receptores ocupados cancelando la función  $f$  tisular desconocida, que es común a ambos fármacos a comparar.**

## Comparación de potencias y efectos de fármacos en un mismo tejido

Puesto que el efecto de un agonista depende de variables del tejido desconocidas, no es posible estimar directamente la afinidad ( $K_A$ ) ni la eficacia intrínseca ( $\epsilon_A$ ) de un agonista a partir de una CCR. Entonces, es habitual comparar las **potencias relativas de dos agonistas comparando las concentraciones necesarias para obtener un mismo efecto**. Considerando que un mismo efecto proviene de igual estímulo, a ese efecto ambos agonistas desencadenan igual estímulo y por lo tanto igual grado de traducción celular desde el receptor y amplificación de la señal ( $f$ ) y comparten los receptores ( $R_t$ ). Las diferencias entre ambos agonistas están en la concentración necesaria para producir ese grado de activación de la señal.

El fármaco más potente será el que produzca el efecto a menor concentración, y sus potencias relativas se podrán calcular como:

$$\text{Potencia de A} / \text{potencia de B} = [B] / [A]$$

Si ambos agonistas son puros, es habitual comparar sus concentraciones efectivas al 50% (CE50).

**¿Cómo se estima la CE50?** A partir de la CCR de un agonista (E% versus log [agonista]) se extrapola y define el pD2 o pCE50 como el logaritmo negativo de la concentración de agonista que produce la mitad del efecto máximo.

El pD2 o pCE50 no expresa la afinidad, sino un parámetro orientativo de la concentración efectiva

$$-\log \text{CE } 50 = \text{pD2}$$

En base a la ecuación (1), la relación efecto versus [agonista] es no-lineal, aunque sólo para algunos muy débiles agonistas parciales, la relación estímulo respuesta puede considerarse lineal. En ese caso y por comparación con las primeras expresiones de Ariens, se ha asumido un cálculo de actividad intrínseca aproximada y basada en los efectos máximos ( $\alpha^E$ ):

$$\frac{E_{A_{\max}}}{E_{\max}} = \alpha^E$$

donde:  $E_{A_{\max}}$  es el efecto máximo del agonista A

y  $E_{\max}$  es el efecto máximo de esa familia en el tejido (dada por un agonista puro).

Esta propiedad permite diferenciar a los agonistas en:

**Agonistas Puros:** son aquéllos que generan la máxima respuesta de un tejido, generalmente son los neurotransmisores o sustancias endógenas, ej: adrenalina, acetilcolina, noradrenalina, histamina y algunos sintéticos como isoproterenol o carbacol, entre otros. Tienen  $\alpha^E=1$

**Agonistas parciales:** son aquéllos que producen una respuesta máxima inferior a la respuesta máxima del tejido. Ej: pilocarpina, oximetaxolina, pindolol. Tienen  $\alpha^E < 1$ .

La **Figura 1** muestra las CCR experimentales de 2 agonistas muscarínicos, uno de ellos puro (acetilcolina, Ach) y el otro parcial (pilocarpina, Pilo). Puede observarse que el  $\alpha^E$  de Pilo es 0.45, y que las CE50 de cada agonista (obtenidas a partir de los respectivos valores de  $-\log CE_{50} = pD_2$  al 50% de sus propios efectos máximos) fueron extrapolados desde efectos diferentes (%Emax) por lo cual no pueden compararse para obtener la potencia.

La extrapolación a un mismo efecto (40% del Emax) permite determinar que la potencia de Ach es mayor que la de Pilo, puesto que extrapolando desde ese efecto en cada CCR al eje de logaritmo de la [agonista], y calculando las [agonista] en molar resulta que:

Al 40% del Emax es:  $\log [Ach] = -1$ , entonces:  $[Ach] = 0,38 \mu\text{g/ml} = 0,68 \mu\text{M}$ ,

y  $\log [Pilo] = 2,4$ , entonces:  $[Pilo] = 0,38 \mu\text{g/ml} = 1,82 \mu\text{M}$

por lo que:  $[Ach]/[Pilo] = 1,82/0,68 = 2,67$

**Resulta que la potencia de Ach es 2,67 veces mayor que la potencia de pilocarpina**

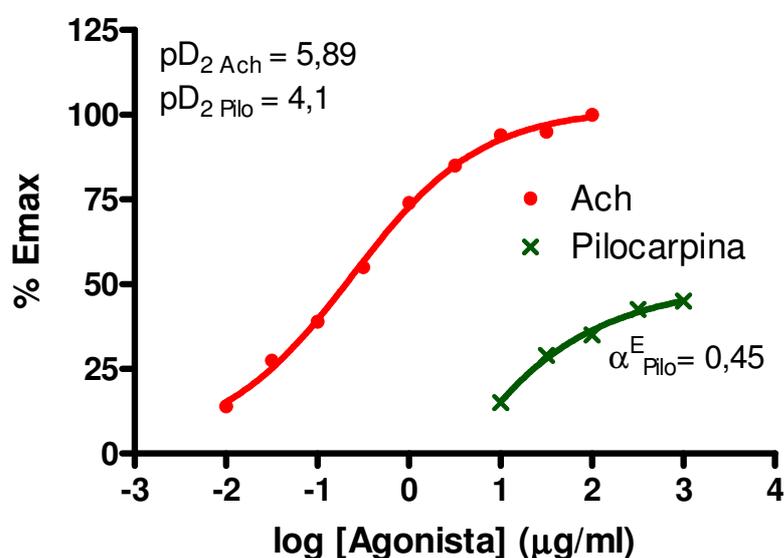


Figura 1: Curvas concentración-respuesta (CCR) obtenidas en un experimento de nuestro laboratorio con intestino aislado de rata y los agonistas acetilcolina (Ach) y pilocarpina (Pilo). El efecto máximo del tejido (100%) fue obtenido con el efecto máximo de Ach (agonista puro), y permitió calcular los % de efecto (%E) de las otras concentraciones de Ach y de Pilo. Las concentraciones se expresaron en µg/ml, pero los parámetros extrapolados de CE50 se convirtieron a molar con los pesos moleculares de Ach (146.14) y de pilocarpina (208.22). Leer en el texto cómo se calculan los  $pD_2=pCE_{50}$ , el  $\alpha^E$  y la potencia relativa.

En general, la **relación estímulo-respuesta es no lineal para los agonistas puros y la mayoría de los parciales**. Esto está determinado por la existencia de "receptores de reserva" que impiden que un antagonista irreversible produzca una caída en el efecto máximo de un agonista.

En 1947 **Nieckerson** realizó una serie de experiencias en las que contrastó el efecto de un agonista puro (histamina) con la reducción de los receptores del tejido, y analizó lo siguiente:

Los inhibidores irreversibles Dibenamina y otras  $\beta$ -haloalquilaminas inhiben en modo no específico al efecto de las aminas simpaticomiméticas y de la estimulación simpática, los efectos de Histamina y Serotonina, y a altas concentraciones bloquearon los efectos parasimpaticomiméticos de acetilcolina sobre músculo liso y aurícula. Nieckerson comunicó el mecanismo de acción de estas sustancias como irreversible, debido a que se unen en modo covalente a los diversos receptores, perdiendo especificidad. En sus experimentos realizados sobre íleon de cobayo estimuló el preparado con 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de Histamina, designando arbitrariamente la máxima respuesta obtenida como 100%. Luego expuso el preparado a dibenamina por 5 minutos y determinó el grado de bloqueo a la dosis estándar de Histamina (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia del inhibidor y luego de sucesivos lavados, a los 5 minutos y a intervalos de 10 minutos. Una pequeña porción del bloqueo fue revertida, pero el bloqueo remanente luego de 10 minutos fue irreversible. Algunas experiencias las continuó durante 8 horas sin encontrar cambios significativos en la reducción del efecto. Si antes de dibenamina introducía Histamina o difenhidramina (antagonista competitivo de la Histamina) se prevenía el desarrollo del bloqueo irreversible, indicando que los tres agentes reaccionan con los mismos receptores. Sobre la base de estos experimentos Nickerson concluyó que en el tejido tratado con dibenamina, una porción de los receptores específicos de Histamina son inactivados esencialmente en forma irreversible, durante un prolongado período de tiempo.

Posteriormente, curvas concentración- efecto (CCR) fueron determinadas sobre segmentos de íleon sin tratar y otras CCR realizadas en los mismos tejidos luego de la exposición a diferentes concentraciones de dibenamina y posterior lavado (a fin de remover el bloqueante no unido irreversiblemente e interrumpir el progreso de la reacción covalente). La respuesta de cada preparación a la dosis de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de Histamina antes del bloqueo se designó como 100 %, y de referencia para el cálculo de las CCR post-bloqueo.

En la figura 2 se presenta un esquema de los resultados encontrados. La CCR de histamina fue desplazada hacia la derecha en el eje de concentraciones después del tratamiento de la primer y más baja concentración del antagonista irreversible ( $I_1$ ), sin cambiar la pendiente ni el efecto máximo (el desplazamiento de la CCR puede atribuirse a que por ley de acción de masas la reducción del número de receptores R requiere aumentar [A] para obtener similar grado de ocupación de receptores [RA] que generará igual estímulo S e igual efecto E). Pero a las más altas concentraciones de dibenamina se disminuye el  $E_{\text{max}}$  de histamina.

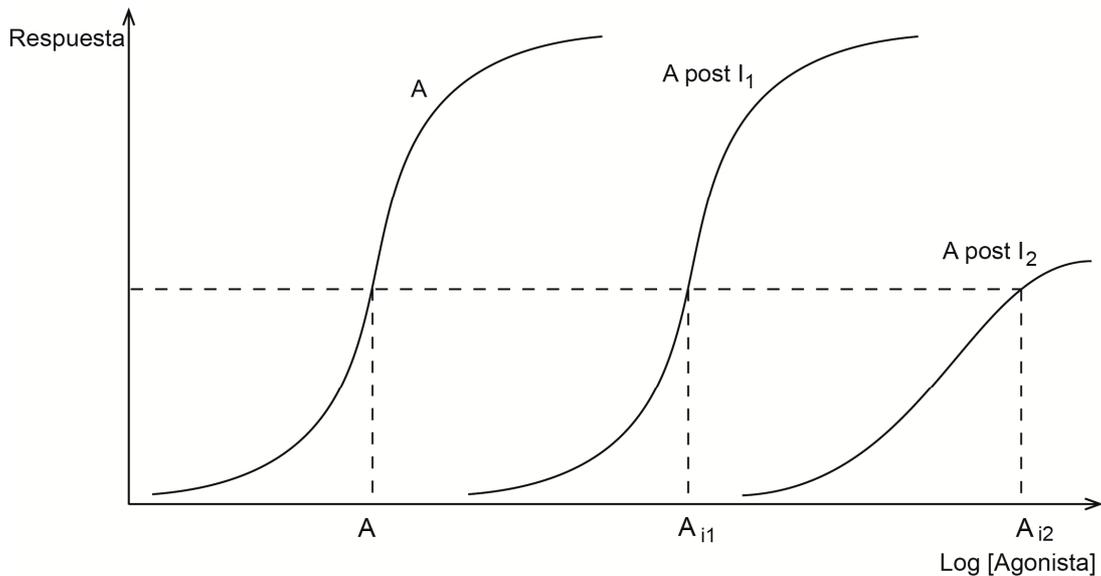


Figura 2: Esquema que representa las curvas concentración-respuesta (CCR) obtenidas en una experiencia análoga a la de Nieckerson (ver texto). Se muestra la CCR del agonista A antes (izquierda) y después del tratamiento del tejido con dos dosis de un antagonista irreversible (dibenamina). Con dosis bajas del antagonista irreversible la CCR se corre a la derecha pero mantiene su  $E_{max}$  (centro). Con concentraciones más altas del antagonista irreversible se produce la reducción del  $E_{max}$  y mayor corrimiento a la derecha de la CCR del agonista. Se comparan las concentraciones de A a un mismo efecto para calcular la  $K_A$  del agonista (ver texto).

Esta experiencia muestra que **puede obtenerse el máximo efecto de un agonista puro en un tejido ( $E_{max}$ ) aun cuando el agonista no ocupa todos los receptores**. Esto demuestra que la relación entre la fracción de receptores ocupados y el efecto no es lineal, y también es no-lineal la relación estímulo-efecto. El número de receptores que pueden eliminarse por acción de un antagonista irreversible sin que caiga el  $E_{max}$  se conoce como **receptores de reserva**, aunque no son diferentes estructuralmente de los que responden. El número de receptores de reserva no puede ser adjudicado a un tejido, sino que está asociado a un agonista dado en un tejido dado. Así, un mismo tejido puede exhibir diferente número de receptores de reserva para dos agonistas dependiendo de cuántos receptores usa cada agonista para dar su efecto. En general, los **agonistas puros** pueden tener un 95 a 99 % de receptores de reserva ya que suelen dar el  $E_{max}$  con solo un 1 a 5% de los receptores totales. En cambio, los **agonistas parciales** tienen un número menor de receptores de reserva (alrededor de 30 a 80 %) porque requieren más receptores para dar su efecto, y su  $E_{max}$  se reduce aún por dosis bajas de un antagonista irreversible. Como consecuencia, para agonistas puros hay una gran diferencia entre la concentración necesaria para ocupar la mitad de los receptores ( $K_A$ ) y la requerida para dar la mitad de la respuesta máxima (concentración efectiva cincuenta,  $EC_{50}$ , estimada a partir del parámetro  $pD_2 = -\log EC_{50}$ ). En cambio, en agonistas parciales ambas concentraciones son parecidas o del mismo orden.

## Agonismo selectivo

Como expresó Furchgott y se explicó anteriormente, la respuesta tisular del agonista A se relaciona hiperbólicamente con la ocupación de receptores, según la siguiente función:

$$\frac{E_A}{E_{\max}} = f \left( \frac{\epsilon [Rt] [A]}{[A] + K_A} \right) \quad (\text{Ec 1})$$

La pendiente de dicha relación refleja la eficacia (e de Stephenson) del mecanismo tisular de traducción del estímulo (S) en respuesta. Pero pueden identificarse 2 factores que determinan esta eficiencia (e): el número de receptores totales (Rt) y la naturaleza de los mecanismos celulares que convierten el estímulo en respuesta (función f). Se describen a continuación:

### **1 - Respuesta tisular (E) en función del estímulo (S) o la ocupación de receptores**

La relación no lineal es generada en el tejido debido a los sistemas celulares de amplificación de señal: si uno de los pasos alcanza la saturación se generará una capacidad de reserva, y si el producto de esa reacción es sustrato para otro proceso saturable se aumentará considerablemente la eficiencia de la traslación del estímulo en respuesta. Un ejemplo es la cascada de liberación de glucosa por estimulación  $\beta$ -adrenérgica, en la que se amplifica 8 órdenes de magnitud la ocupación de receptores con las etapas de activación sucesiva de proteína Gs, adenilatoclasa, AMPc, PKA y fosforilación de proteínas varias.

Hay muchos ejemplos farmacológicos que demuestran funciones hiperbólicas entre la ocupación de receptores y los mecanismos que preceden a la respuesta del tejido y conforman la cascada de acoplamiento estímulo-respuesta. Algunos son: ocupación del receptor muscarínico y activación de la cascada: proteína Gq, PLC, IP3/DAG, PKC, fosforilación de canales y transporte de calcio. También la ocupación del receptor adrenérgico vía la adenilatoclasa se amplifica para generar inotropismo positivo en corazón. Otro ejemplo de cascada amplificada es la iniciada por activación de sólo una fracción de fibras cardíacas por un agonista para dar la respuesta de todo el sincicio cardíaco.

Es importante notar que **cada tejido puede tener una diferente amplificación de la señal del receptor (función f)** porque en cada paso es variable el número de unidades que se activan en cada etapa de traducción de la señal iniciada en el receptor. Por ejemplo, cuántos ciclos de proteínas Gs se activan, cuántas moléculas de AMPc se generan por la catálisis de AC, cuántas PKA se activan por el AMPc, etc. Por ello, puede haber diferencias entre especies de animales de laboratorio (rata, ratón, cobayo, conejo) para la amplificación de un mismo par de agonista y tejido (ej. NA en vaso deferente). También, en un mismo organismo habrá diferencias de amplificación para un mismo par agonista-receptor en diversos tejidos (ej. Ach en receptores M en duodeno, íleon, yeyuno, detrusor, circular del ojo, etc.).

### **2-Densidad de receptores**

Hay evidencias de que **cuanto mayor sea el número de receptores del tejido, mayor es la respuesta a un agonista**. Por ej. la respuesta a oxotremorina del íleon de cobayo es mayor

que la de íleon de ratón, correlacionándose sus potencias relativas con el número de receptores muscarínicos de los respectivos tejidos estimados por estudios de "binding". Otros ejemplos son la pérdida de sensibilidad del íleon al tratamiento con dibenammina (irreversible) que es paralelo a la reducción de receptores detectada por "binding", y la desensibilización de la aurícula de rata al isoproterenol por implantación de bombas miniosmóticas que se correlaciona con la reducción del número de receptores.

### **Agonismo selectivo**

Generalmente, la clasificación de un cierto receptor en un tejido se hace sobre la base de la respuesta (o no) del mismo a un agonista selectivo (clasificado sobre otro tejido ya conocido). Si el tejido no responde significa que los receptores para ese agonista no están presentes en ese tejido o que el mecanismo de estímulo-respuesta del tejido produjo insuficiente amplificación del estímulo para generar una respuesta observable. Ej. prenalterol, un agonista parcial  $\beta$ -adrenérgico relativamente débil mostró tener afinidad y eficacia por  $\beta_1$ . Sin embargo, no produce respuesta en la arteria coronaria canina que contiene esos receptores, aunque probó ser un antagonista competitivo de isoproterenol en dicho tejido. Esto muestra que la arteria coronaria canina no posee un mecanismo estímulo-respuesta suficientemente eficiente para permitir a este agonista parcial débil mostrar su respuesta, aunque el fármaco interacciona con los receptores.

Si un agonista selectivo da respuesta en un tejido es una evidencia para decir que ese receptor se encuentra en el tejido. Sin embargo, debe distinguirse entre selectividad y especificidad. La experiencia muestra que **las drogas son selectivas pero no específicas**. Eso significa que a concentraciones intermedias o terapéuticas actuará preferentemente en un tipo de receptores (selectividad), pero si se aumentaran las concentraciones podrá actuar en otros tipos de receptores por los cuales es menos afín (no tiene especificidad) Por ej. los agonistas selectivos  $\beta_1$  prenalterol y dobutamina dan también respuesta en el útero de rata, que solo contiene receptores  $\beta_2$ , mostrándose que también tienen afinidad y eficacia por estos receptores, aunque generalmente menor que por los  $\beta_1$  (a mayores dosis). Es importante no asumir especificidad para los agonistas.

Por otra parte, la desensibilización de los receptores de un tejido por tratamiento con agentes alquilantes irreversibles es un método empleado para diferenciar agonistas con diversa eficacia intrínseca en un tejido, pero no es lo suficientemente selectivo para diferenciar clases de receptores, por lo que debería emplearse en un tejido con un solo tipo de receptores o con un agonista con selectividad por sólo un tipo de receptores. Por ejemplo si un agonista tiene un 30 % de receptores de reserva y el otro un 50 % este último se afectará más en su respuesta máxima por la alquilación de una fracción de los receptores, aunque eso no implica que actúen en diferentes receptores.

En conclusión, ambos factores (la diferente eficiencia en el acoplamiento estímulo-respuesta entre dos tejidos, o la desensibilización de un tejido por alquilación de receptores) bloquearán preferentemente al agonista con la más baja eficacia intrínseca (Figura 3).

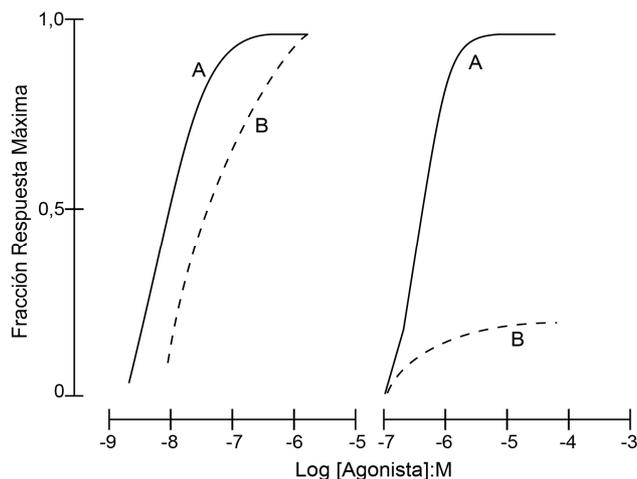


Figura 3: Efectos del cambio del número de receptores sobre agonistas puros con diferentes relaciones de eficacia y afinidad. El número de receptores es mayor en el tejido de la izquierda que en el tejido de la derecha. Eso origina que los agonistas A y B que se comportan como puros en el tejido de la izquierda pasen a tener menor potencia en el tejido de la derecha y el agonista B pase a comportarse como parcial.

La selectividad puede explicarse en base a la ecuación de Furchgott (Ec. 1):

$$\frac{E_A}{E_{\max}} = f \left( \frac{\epsilon [Rt] [A]}{[A] + K_A} \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

Puesto que un agonista parcial tendrá baja eficacia intrínseca ( $\epsilon$ ) requerirá un tejido con alta eficiencia de acoplamiento estímulo-respuesta ( $f$ ) o alto número de receptores ( $Rt$ ) para lograr expresar su efecto. Si alguno de ellos o ambos son bajos, el agonista parcial reducirá su  $E_{\max}$ , incluso al punto de desaparecer. Sin embargo, su afinidad por el receptor no se alterará, por lo cual incluso podría competir con el agonista. Por ello, los agonistas parciales pueden expresarse como antagonistas en ciertos tejidos. Esta condición de **agonismo selectivo** es muy útil terapéuticamente, porque permite obtener un efecto beneficioso de un agonista en algún tejido, sin los efectos adversos de estimulación de otro tejido, ya que en este puede dar un efecto más reducido o incluso bloquear el efecto del agonista endógeno (puro). Se verán más adelante estas interacciones competitivas que dan efectos duales.

## Determinación de la afinidad y eficacia intrínseca relativa de agonistas

### Afinidad

a) La afinidad se define como la recíproca de la constante de disociación de la droga por el receptor ( $K_A$ ) y se puede estimar por un método de "binding" o por el método farmacológico de los antagonistas irreversibles. La premisa básica de este método es *que concentraciones equi-*

tativas del agonista antes y después de la eliminación de una fracción de los receptores pueden ser comparadas para obtener diferencias que dependen del número de receptores y de la afinidad del agonista.

La naturaleza nula de este método permite cancelar las variaciones que surgirían del mecanismo de conversión del estímulo en respuesta al comparar exclusivamente respuestas iguales provenientes de estímulos iguales independizándose del grado de ocupación del receptor.

El **método de binding** consiste en poner en contacto un fármaco marcado (\*, por radioactivo o fluorescencia). Una vez finalizada la reacción por el contacto, se separan la fracción que queda en el tejido (unido o RA\*) y el sobrenadante (R\*). De la  $K_A$  se deduce que:

$$K_A = [R] \cdot [A] / [RA] \text{ , entonces: } [RA] = ([Rt] - [RA]) \cdot [A] / K_A \text{ ; } [RA]^* / [A]^* = [Rt] / K_A - [RA] / K_A$$

La última función representa una recta, tal que si se grafica unido/libre en función de unido, se obtiene una recta de pendiente positiva e igual a  $1/K_A$  (afinidad) y de la ordenada  $([Rt]/K_A)$  se calcula el número de receptores totales (Rt).

Esta representación se conoce como **Gráfico de "Scatchard"**

b) Para conocer la afinidad de un agonista puro el **método farmacológico de los antagonistas irreversibles** es el siguiente:

Es posible calcular la constante de disociación de los agonistas reduciendo la cantidad de receptores con un antagonista irreversible, y aplicando el concepto que efectos iguales provienen de estímulos iguales (método nulo). En la Figura 2 se observan los efectos de un agonista antes y después de tratar al tejido con dibenammina. Es posible comparar las concentraciones del agonista a un mismo efecto, eligiendo el tratamiento con irreversible que reduce el  $E_{max}$ .

Si  $E_A = E_{A_i}$  , entonces  $S_A = S_{A_i}$

$$S_A = f \left( \frac{[Rt] \cdot \epsilon_A [RA]}{[Rt]} \right)$$

$$S_{A_i} = f \left( \frac{[Ri] \cdot \epsilon_A [RA]}{[Ri]} \right)$$

$$S_A = f \left( \frac{[Rt] \cdot \epsilon_A [RA]}{[Rt]} \right)$$

Si  $S_A = S_{A_i}$  y se cancelan factores comunes, resulta:

$$[Rt] \cdot \frac{[A]}{K_A + [A]} = [Ri] \cdot \frac{[A_i]}{K_A + [A_i]}$$

$$\frac{[A]}{(K_A + [A])} = \frac{Ri}{Rt} \cdot \frac{[A_i]}{(K_A + [A_i])} \quad Ri/Rt = g_i$$

$$\frac{1}{1 + \frac{K_A}{[A]}} = g_i \frac{1}{1 + \frac{K_A}{[A]_i}}$$

$$g_i + g_i \frac{K_A}{[A]} = 1 + \frac{K_A}{[A]_i}$$

$$\frac{[A]}{[A]_i} = g_i - \frac{1 - g_i}{K_A}$$

Reordenando la función a:

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_i g_i} + \frac{1 - g_i}{K_A \cdot g_i} \quad \text{y graficando } 1/[A] \text{ vs } 1/[A]_i$$

Resulta  $K_A = \frac{\text{pendiente} - 1}{\text{ordenada}}$  para un agonista puro

Para calcular la **afinidad de un agonista parcial** dos métodos pueden ser empleados:

a) *La comparación de dosis equiactivas de un agonista puro y uno parcial en el mismo tejido:*

Considerando las CCR de la Figura 1, se pueden encontrar varios pares ordenados a igual efecto:

$E_A = E_P$ , entonces:

$$f. [Rt] \cdot \varepsilon_A \cdot \frac{[A]}{K_A + [A]} = f. [Rt] \cdot \varepsilon_P \cdot \frac{[P]}{K_P + [P]}$$

siendo A un agonista puro y P uno parcial, se puede asumir que la [A] necesaria para dar efecto es mucho menor que la  $K_A$  (ver antes). Por lo tanto, y debido a que el ensayo se debe realizar en el mismo tejido (son constantes f y Rt), resulta:

$$[A] = \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A} \cdot K_A \cdot \frac{[P]}{[P] + K_P}$$

Y

$$1/[A] = \varepsilon_A/\varepsilon_P * 1/K_A + \varepsilon_A/\varepsilon_P * K_P/K_A * 1/[P]$$

la  $K_P$  puede calcularse por el cociente pendiente/ordenada de la recta que puede construirse si se grafica  $1/[A]$  vs.  $1/[P]$  para efectos constantes en el mismo tejido. Para las CCR de Ach y Pilocarpina de la Figura 1, la recta y el cálculo de la  $K_P$  resultan:

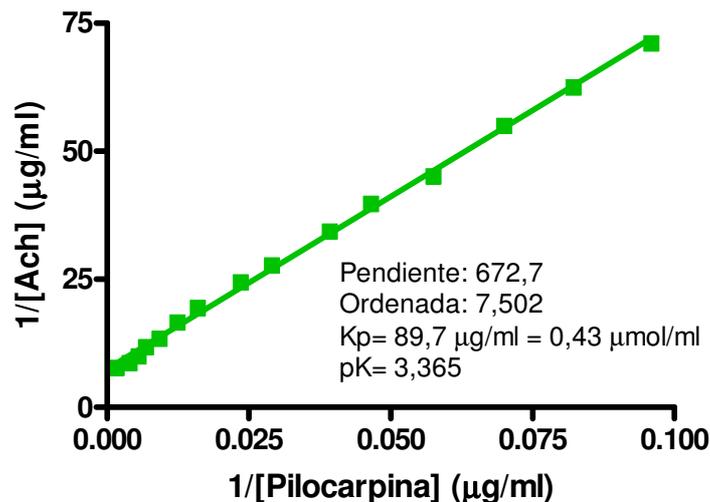


Figura 4: Cálculo de la  $K_P$  del agonista parcial pilocarpina: representación de la recta obtenida comparando las concentraciones de Ach y Pilo para varios puntos de efectos iguales, a partir de las CCR obtenidas en la Figura 1. Observar que la  $K_P$  se obtuvo a partir del cociente pendiente / ordenada y se expresó en molar (PM pilocarpina 208.22) (ver texto).

b) *El antagonismo competitivo que produce un agonista parcial sobre uno puro en un tejido con baja eficiencia estímulo-respuesta:*

Para efectuar esta comparación, es necesario que el agonista parcial no se exprese en el tejido. Esto puede lograrse realizando la CCR en un tejido con baja eficiencia estímulo-respuesta. Si ello no ocurre, puede reducirse el número de receptores con un agente alquilante controlado para lograr la desaparición de la respuesta al agonista parcial, manteniendo la respuesta al agonista puro (como lo muestra la Figura 3). Bajo esta condición el agonista parcial seguirá teniendo afinidad por los receptores libres pero su baja eficacia intrínseca ( $\epsilon$ ) sumada a una baja eficiencia estímulo-respuesta del tejido ( $f$ ) y a un reducido número de receptores ( $R_t$ ) le impedirán dar efecto agonista, pero le conferirán propiedades de antagonista competitivo del agonista puro. La ecuación 1 permite evaluar el aporte de cada parámetro, y deducir que aún en esta reducción de  $R_t$  el agonista puro consigue expresarse gracias a su alta eficacia intrínseca.

Entonces, la  $K_p$  del agonista parcial puede estimarse a partir del cálculo del  $pA_2$  ( $pK_A$  del antagonista competitivo) que se calculará a partir de una regresión de Schild (ver antagonismo competitivo más adelante).

## Eficacia intrínseca

Los métodos nulos posibilitan estimar la eficacia intrínseca relativa de dos agonistas en términos del concepto de Furchgott, ya que no hay una escala absoluta de eficacias independiente del mecanismo estímulo-respuesta de los tejidos. La eficacia intrínseca relativa es importante para caracterizar la interacción droga-receptor, y por lo tanto es útil en la clasificación de drogas y receptores. Puede calcularse por comparación de dosis equiactivas de los agonistas A y B en un mismo tejido, considerando la función que representa al efecto de un agonista, y cancelando factores comunes:

$$E_A = E_P$$

$$\epsilon_A \frac{[A]}{K_A + [A]} = \epsilon_B \frac{[B]}{K_B + [B]}$$

Si ambos agonistas son puros ( $\alpha^E = 1$ ) será  $[A]$  o  $[B] \gg K_A$  o  $K_B$  respectivamente y:

$$\frac{\epsilon_A}{\epsilon_B} = \frac{[B] \cdot K_A}{[A] \cdot K_B}$$

Si alguno o ambos agonistas son parciales, resultará:

$$\frac{\epsilon_A}{\epsilon_B} = \frac{[B] \cdot (K_A + [A])}{[A] \cdot (K_B + [B])}$$

se desprende que la eficacia intrínseca relativa puede tomar valores mayores o menores que 1 y provee una buena comparación entre agonistas.

## Interacción competitiva entre dos fármacos

Presumamos que dos drogas A y B con eficacias intrínsecas  $\epsilon_A$  y  $\epsilon_B$  interactúan con el mismo sistema receptor-efector.

Los receptores totales se distribuirán en:  $R_t = [R] + [RA] + [RB]$

Y el efecto combinado de A y B está compuesto por el efecto de [A] en presencia de [B], incrementado por el efecto de [B] en presencia de [A].

$$E_{AB} = E_{A[B]} + E_{B[A]}$$

El efecto causado por [A] estará influenciado por la presencia de B, y viceversa.

Si aplicamos la ecuación 1 previamente deducida se obtendrá el efecto de A  $E_{A(B)}$ , como:

$$\begin{aligned} \frac{E_{A(B)}}{E_{\max}} &= f(\epsilon_A \cdot R_t \cdot \frac{[RA]}{[R] + [RA] + [RB]}) = f(\epsilon_A \cdot R_t \cdot \frac{[R][A] / K_A}{[R] + \frac{[R][A]}{K_A} + \frac{[R][B]}{K_B}}) = \\ &= f(\epsilon_A \cdot R_t \cdot \frac{1}{1 + (1 + \frac{[B]}{K_B}) \frac{K_A}{[A]}}) \end{aligned}$$

Un razonamiento análogo se puede hacer para  $E_{B[A]}$ , tal que:

$$\frac{E_{A(B)}}{E_{\max}} = f \left( R_t \left( \frac{\epsilon_A}{1 + (1 + \frac{[B]}{K_B}) \frac{K_A}{[A]}} + \frac{\epsilon_B}{1 + (1 + \frac{[A]}{K_A}) \frac{K_B}{[B]}} \right) \right) \quad \text{Ec. 2}$$

La comparación de la última ecuación (2) con la Ec. (1) (para un solo agonista A en ausencia del competidor), nos indica que la influencia de B sobre la ocupación de receptores por A se encuentra expresada únicamente en el factor por el cual  $K_A$  es multiplicado por  $(1 + [B]/K_B)$ . Este factor es siempre mayor que 1, y el resultado sugiere que la presencia de B genera un aumento aparente de la constante de disociación  $K_A$ . Esto podría esperarse desde que la competición que experimenta A con B reduce la ocupación de los receptores por A, análogamente a lo que podría ser causado por una disminución de la afinidad de A.

### **Implicaciones del modelo de la interacción competitiva**

Tres tipos de interacción competitiva entre el agonista A y una droga B pueden obtenerse, lo cual depende de la actividad intrínseca de B:

- si  $\alpha^E$  de A es mayor que el de B ( $\beta^E$ ) o si tienen el mismo valor ( $\beta^E = \alpha^E$ ) B actuará como un sinergista competitivo de A. Un grupo de curvas teóricas basadas en la ecuación (2), ilustran el sinergismo competitivo de los agonistas puros:

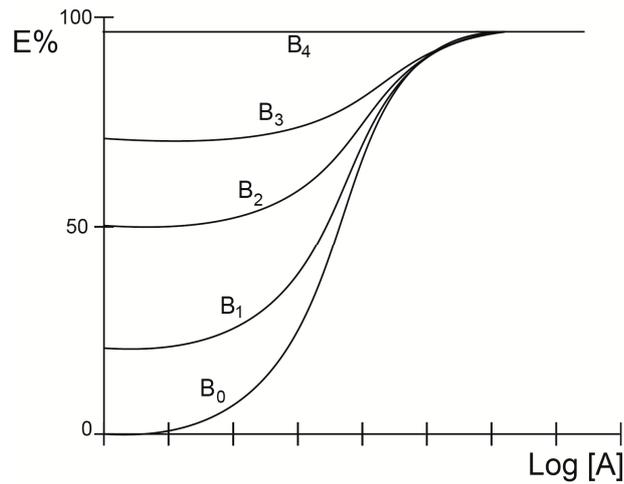


Figura 5: Sinergismo competitivo: esquema que representa las curvas concentración-respuesta (CCR) obtenidas para un agonista A puro en ausencia ( $B=0$ ) y presencia de otro agonista puro B (ambos tienen  $\alpha^E = 1$ ). A dosis bajas del agonista A hay sinergismo de efectos con B. (ver texto).

- b) si el valor de  $\beta^E$  cae entre el de  $\alpha^E$  y 0, B es un agonista parcial, o también llamado dualista competitivo. Dependiendo de la concentración de A, B actuará como sinergista o como antagonista dependiendo de la [a]. Un grupo de curvas teóricas y prácticas ilustran el dualismo competitivo:

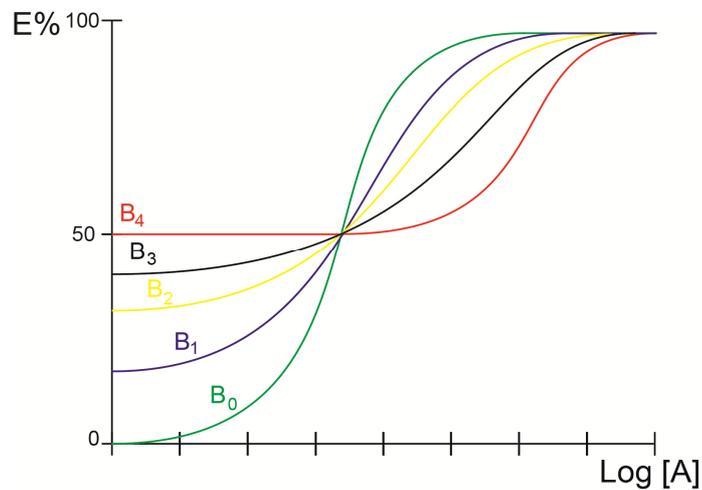


Figura 6: Dualismo competitivo: esquema que representa las curvas concentración-respuesta (CCR) obtenidas para un agonista A puro ( $\alpha^E = 1$ ) en ausencia ( $B=0$ ) y presencia de otro agonista B parcial ( $\beta^E = 0,5$ ). A dosis bajas del agonista A hay sinergismo de efectos con B, pero a dosis altas de A hay un antagonismo competitivo de B. (ver texto).

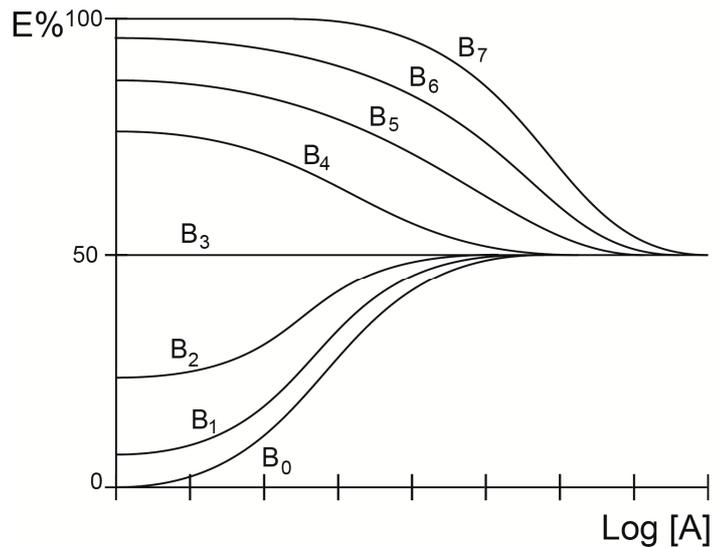


Figura 7: Dualismo competitivo: esquema que representa las curvas concentración-respuesta (CCR) obtenidas para un agonista A parcial ( $\alpha^E = 0,5$ ) en ausencia ( $B = 0$ ) y presencia de otro agonista B puro ( $\beta^E = 1$ ). A dosis bajas del agonista A hay sinergismo de efectos con B (curvas por debajo del 50% E), pero a dosis altas de B y de A hay un antagonismo competitivo (curvas por encima del 50% E).

c) si  $\beta^E = 0$ , B se comportará como un **antagonista competitivo** de A. En este caso la ecuación (2) se transforma en

$$\frac{E_{AB}}{E_{max}} = f_{Rt} \left( \frac{\epsilon_A}{1 + \left(1 + \frac{[B]}{K_B}\right) \frac{K_A}{[A]}} \right) \quad \text{Ec. 3}$$

B causará un corrimiento de la curva concentración-efecto a lo largo del eje de la concentración logarítmica, sin cambiar la forma, ni la altura. La Figura 7 muestra las CCR típicas de un agonista puro (acetilcolina,  $\alpha^E = 1$ ) en ausencia y presencia de un antagonista competitivo (atropina,  $\beta^E = 0$ ).

## Antagonismo competitivo

Esta interacción se interpretó de la siguiente forma, para determinar los parámetros característicos:

Comparando nuevamente efectos iguales, en ausencia de B un cierto efecto es causado por la concentración de agonista  $[A]_1$ , y en su presencia el mismo efecto es causado por  $[A]_2$ , por lo cual:

$$\frac{E_{A1}}{E_{max}} = \frac{E_{A2B}}{E_{max}}$$

Aplicando la ecuación (1) y la (3) tenemos, sabiendo que iguales efectos provienen de estímulos iguales:

$$\frac{\varepsilon_A}{1 + \frac{K_A}{[A]_1}} = \frac{\varepsilon_A}{1 + \left(1 + \frac{[B]}{K_B}\right) \frac{K_A}{[A]_2}}$$

Simplificando los factores iguales, resulta:

$$\frac{[A]_2}{[A]_1} = 1 + \frac{[B]}{K_B} \quad \text{Ec. 4}$$

Como las concentraciones se expresan en escala logarítmica:

$$\log \frac{[A]_2}{[A]_1} = \log \left( 1 + \frac{[B]}{K_B} \right)$$

La magnitud del corrimiento a la derecha de la CCR depende sólo de la concentración y de la afinidad del antagonista B. En este caso la relación entre estímulo y efecto no interesa, dado que se comparan efectos iguales que provienen de estímulos iguales, y el factor tisular desconocido  $f \cdot R_t$  es constante en ambas curvas (sin y con antagonista).

A partir de la ecuación (4) se puede calcular la constante de afinidad de un antagonista competitivo:

$$\frac{[A]_2}{[A]_1} = 1 + \frac{[B]}{K_B} \quad \text{sigue} \quad \frac{[A]_2}{[A]_1} - 1 = \frac{[B]}{K_B}$$

Hacemos  $X = \frac{[A]_2}{[A]_1}$  y tomamos logaritmos

$$\log (X - 1) = \log B - \log K_B$$

$$-\log K_B = -\log [B] + \log (X - 1)$$

Definimos ahora  $pA_2$ : es el logaritmo negativo de la concentración molar de antagonista, en presencia de la cual es necesario duplicar la concentración de agonista para obtener el efecto original.

$$pA_2 = -\log [B] + \log (X - 1) \quad \text{Ec. 5}$$

Dado que cuando  $A_2 = 2 A_1$ , resulta  $pA_2 = -\log K_B = -\log [B]_{(2A_1)}$

En la Figura 8 se muestran las CCR obtenidas experimentalmente para la interacción competitiva en los receptores muscarínicos entre el agonista acetilcolina (Ach) y el antagonista competitivo atropina. Se ha marcado un efecto común a ambos en la zona de mayor pendiente, a partir del cual se pueden extrapolar las concentraciones de agonista en presencia ( $A_2$ ) y ausencia ( $A_1$ ) del antagonista. Con esos datos, se calcula el  $pA_2$  aplicando la ecuación 5.

En la Figura 9 se muestran CCR obtenidas experimentalmente para la interacción competitiva en los receptores alfa y beta adrenérgicos.

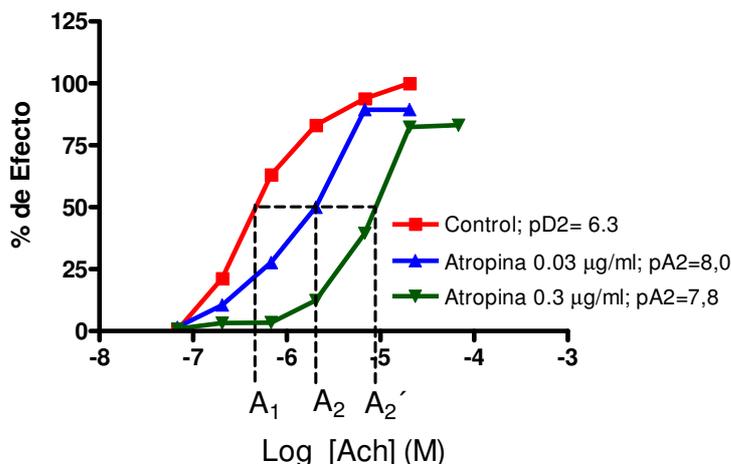


Figura 8: Curvas concentración-respuesta (CCR) obtenidas en experimentos de nuestro laboratorio con intestino (íleon) aislado de rata en el que se efectuó contracción acumulativa por el agonista acetilcolina en ausencia y presencia de dos concentraciones del antagonista muscarínico atropina. Observar que la CCR se desplaza competitivamente hacia la derecha, aumentando la concentración del agonista desde A1 a A2 y a A2'. A partir de esos datos se calculó su  $pA_2 = pK_B$  según se explica en el texto (Ec. 5). Los valores son independientes de la [B] y sólo tienen la variabilidad biológica, por lo cual pueden promediarse en un grupo de n determinaciones. Las concentraciones del agonista se expresaron en  $\mu\text{g/ml}$ , pero los parámetros extrapolados de  $pD_2 = pCE_{50}$  y su función p (-log) se convirtieron a molar con el peso molecular de acetilcolina (146.14). Las concentraciones de los antagonistas (B) se expresaron en molar y se calcularon sus  $pA_2 = pK_B$  según se explica en el texto (Ec. 5).

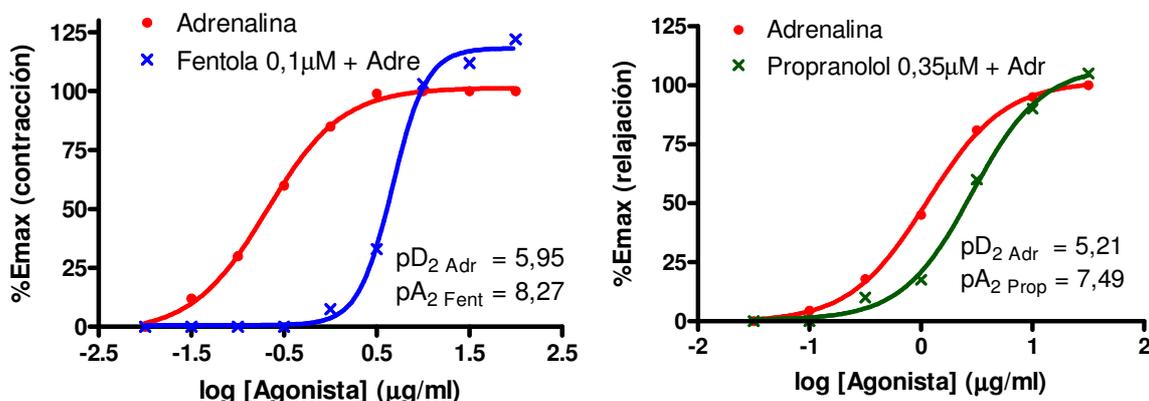


Figura 9: Curvas concentración-respuesta (CCR) obtenidas en experimentos de nuestro laboratorio con conducto deferente aislado de rata en el que se efectuó contracción acumulativa por el agonista adrenalina (izquierda) y en el intestino aislado de rata precontracturado con medio de alta  $[K^+]_e$  (40 mM) y relajado acumulativamente por el agonista adrenalina (derecha). En el conducto deferente se observa que el antagonista  $\alpha$ -adrenérgico fentolamina desplaza competitivamente la CCR hacia la derecha, por lo que la contracción ocurre por receptores de tipo  $\alpha$ -adrenérgicos. En el intestino aislado, el beta-bloqueante propranolol desplazó la CCR a la derecha, por lo cual la relajación de adrenalina era producida por receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Las concentraciones de los agonistas se expresaron en  $\mu\text{g/ml}$ , pero los parámetros extrapolados de  $pD_2 = pCE_{50}$  y su función p (-log) se convirtieron a molar con el peso molecular de adrenalina (183.2). Las concentraciones de los antagonistas (B) se expresaron en molar y se calcularon sus  $pA_2 = pK_B$  según se explica en el texto (Ec. 5).

## Gráfico de Schild

En la práctica, para establecer indudablemente que un antagonista B es competitivo con un agonista A, es preciso evaluar más de una concentración de B. Schild ha trabajado la relación entre el grado de desplazamiento y la [B] de la siguiente manera:

De la Ec. 5 surge que:

$$\text{Log} ([A_2]/[A_1] - 1) = pA_2 + \log [B]$$

Esta función se representa como una recta si se grafica el log (X-1) en función del log [B]. Esa recta debe tener pendiente igual a 1, y la abscisa al origen es pA2 (Figura 10).

Entonces, si al representar los resultados de las CCR de un mínimo de tres [B] se obtiene una recta de pendiente no diferente estadísticamente de 1, es posible demostrar que hay antagonismo competitivo, y la abscisa al origen arroja el valor de pA2.

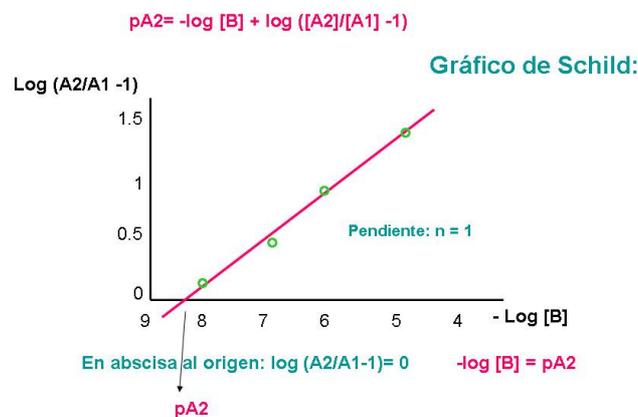


Figura 10: Esquema que representa al gráfico de Schild obtenido a partir de los desplazamientos en la concentración del agonista A desde A1 hacia A2 a igual efecto, por la aplicación de cuatro [B] crecientes (expresadas en Molar). En el ajuste de la mejor recta debe obtenerse la pendiente no diferente de 1.

La abscisa al origen permite obtener el  $pA_2 = pK_B$  según se explica en el texto.

## Interacción metactóide o no competitiva

Supongamos que dos drogas, A y B' interactúan con dos tipos de receptores. Estos receptores, R y R' son independientes uno del otro e interactúan con A y B', respectivamente, pero los sistemas receptor-efector están interrelacionados más allá del nivel de los receptores.

B' y A son agonistas de sus propios receptores, pero el estímulo causado por la interacción de B' con sus propios receptores R' ( $S'_B$ ) no encuentra expresión en un efecto medible, sino que altera el efecto de A. Esta alteración es directamente proporcional al estímulo  $S'_B$ . Si la alteración es una disminución, B puede ser llamado **antagonista metactóide**, y si es un incremento B será un **sinergista metactóide**. Los antagonistas metactóides son más abundantes.

Se puede considerar que en presencia de una dada [B'], el efecto de A bajo la influencia de B' ( $E_{AB}$ ) tendrá un grado menor de interferencia que el efecto de A en presencia del máximo

estímulo en el sistema metactoide R' ( $E_{AS'_{max}}$ ). El efecto de B' puede suponerse como la inserción de un factor de interferencia entre la ocupación de receptores por A y el efecto causado por la interacción de A con R.

El efecto de A ( $E_A$ ) es modificado por el estímulo metactoide de B', tal que el valor en el máximo estímulo metactoide  $E_{AS'_{max}}$  tiene una relación fija con el valor  $E_A$ . Esa misma relación existe a todas las [A] y  $E_A$ , incluso entre el máximo efecto del agonista bajo la influencia del máximo estímulo del sistema metactoide,  $E_{maxS'_{max}}$  y el original  $E_{max}$  del agonista solo. Esto es representado por:

$$E_{AS'_{max}} = p E_A$$

Donde  $p = E_{AS'_{max}}/E_A$ , es el valor que caracteriza la interrelación entre el agonista y el sistema metactoide, y se interpreta como el máximo grado de interferencia del sistema metactoide en el efecto del agonista A.

Puesto que B' interacciona con sus propios receptores R' para generar el estímulo  $S'_B$ , no distingue entre diferentes agonistas, y podemos aplicar las ecuaciones de su interacción fármaco-receptor con validez general.

El estímulo generado cuando una dada [B'] interactúa con sus receptores R' ( $S'_B$ ) es una fracción del máximo estímulo metactoide ( $S'_{max}$ ) y es proporcional a la fracción de receptores R' ocupados:

$$([R'B']/R't) = [B'] / ([B'] + K_{B'})$$

La constante de proporcionalidad representa la actividad intrínseca de B' ( $\beta'$ ), y entonces:

$$\frac{S'_B}{S'_{max}} = \frac{\beta'}{1 + \frac{K'_{B'}}{[B]}} \quad \text{Ec. 6}$$

Como la alteración causada por la droga metactoide o no competitiva en el efecto del agonista ( $E_A$ ) se supone directamente proporcional al estímulo metactoide, es posible describir al estímulo de B' como una fracción del máximo estímulo metactoide,  $S'_B/S'_{max}$ , y como un cambio en el  $E_A$  ( $E_A - E_{AB'}$ ) que es una fracción del máximo cambio causado por el sistema metactoide ( $E_A - E_{AS'_{max}}$ ), resultando:

$$\frac{S'_B}{S'_{max}} = \frac{E_A - E_{A'B}}{E_A - E_{AS'_{max}}} = \frac{\beta'}{1 + \frac{K'_{B'}}{[B]}} \quad \text{en el caso de antagonismo}$$

$$\text{y } \frac{S'_B}{S'_{max}} = \frac{E_{A'B} - E_{A'}}{E_{AS'_{max}} - E_A} \quad \text{para sinergistas} \quad \text{Ec. (6 a-b)}$$

Entonces, para un antagonista metactoide será:

$$E_{A'B} = E_A + (E_A - E_{AS'_{max}}) \frac{\beta'}{1 + \frac{K'_{B'}}{[B]}}$$

$$y \quad E_{A'B} = \left\{ 1 + (1 - \frac{E_{AS'_{max}}}{E_A}) \frac{\beta'}{1 + \frac{K'_B}{[B]}} \right\} E_A$$

$$E_{A'B} = \left\{ 1 + (1 - p) \frac{\beta'}{1 + \frac{K'_B}{[B]}} \right\} E_A$$

Y dividiendo por  $E_{max}$  se obtendrá:

$$\frac{E_{A'B}}{E_{max}} = \left\{ 1 + (1 - p) \frac{\beta'}{1 + \frac{K'_B}{[B]}} \right\} \frac{\alpha}{1 + \frac{K_A}{[A]}} \quad \text{Ec. 7}$$

$\beta$  y  $K_B$  son constantes para cada fármaco metactoide, y representan respectivamente su actividad intrínseca y afinidad por el sistema o receptor metactoide. Pueden utilizarse para comparar miembros de una familia de fármacos. Por ejemplo, los bloqueantes de los canales de  $Ca^{2+}$  son una familia de antagonistas metactoides, ya que actúan en sus propios receptores (canal L) e interfieren en el efecto contráctil de varios agonistas en grados que dependen sólo de la concentración del bloqueante cálcico (Figura 11).

El valor  $p$  es constante para una familia y su valor caracteriza la interrelación entre el agonista y el sistema metactoide. Si la influencia de dos drogas metactoides sobre el efecto de un agonista es descrito con valores diferentes de  $p$ , los antagonistas no pertenecen a la misma familia.

La actividad intrínseca del fármaco no competitivo metactoide será:

$$B''^E = \frac{E_A - E_{ABmax}}{E_A - E_{AS'_{max}}} \quad \text{Ec 8}$$

donde el numerador representa el máximo cambio que  $B'$  puede causar a  $E_A$ , y el denominador da el máximo cambio en  $E_A$  que puede ser causado por los receptores de  $B'$  de cualquier miembro de la familia. Si la relación estímulo-efecto es lineal  $\beta^E = \beta$  y tiene valores entre 0 y 1 para sinergista y antagonista. La diferencia está en el valor de  $p$ ; si cae entre 0 y 1 es un antagonista y si  $p$  es mayor que 1 es un sinergista.

En la Figura 10 se muestran las CCR de un agonista puro  $A$  ( $\alpha^E = 1$ ) en presencia de concentraciones crecientes de un antagonista metactoide (verapamilo) que tiene la capacidad de inhibir totalmente al  $E_{Amax}$ , por lo cual será  $p=0$  y  $\beta'=1$ . Entonces, la ecuación (7) se reduce a:

$$\frac{E_{A'B}}{E_{max}} = \frac{\alpha}{\left(1 + \frac{[B]}{K'_B}\right) \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)}$$

La afinidad del fármaco metactoide se estima a partir del parámetro denominado  $pD'_2 = -\log K_B$ . Para el cálculo se parte de la ecuación, obtenida a partir de las Ec. 6 a y Ec. 8:

$$\frac{E_A - E_{AB'}}{E_A - E_{AS'_{max}}} = \frac{\beta'}{1 + \frac{K'_B}{[B]}}$$

Como el estímulo metactoides es directamente proporcional al "efecto" metactoides, se puede sustituir el valor de  $\beta'$  por el de  $\beta^E$  y si el mismo es igual a 1 (por inhibir completamente al  $E_A$ ) el efecto del antagonista metactoides se estima como:

$$\frac{E_A - E_{AB'}}{E_A - E_{AB'_{max}}} = \frac{1}{1 + \frac{K'_B}{[B]}}$$

$$\frac{K'_B}{B} = \frac{E_A - E_{AB'_{max}}}{E_A - E_{AB'}} - 1 \quad \text{Ec. 9}$$

Y aplicando logaritmos a la ecuación, resulta:

$$\log K'_B = \log [B'] + \log \frac{(E_A - E_{AB'_{max}}) - 1}{E_A - E_{AB'}}$$

Y

$$pD'2 = -\log [B'] - \log \frac{(E_A - E_{AB'_{max}}) - 1}{E_A - E_{AB'}}$$

El  $pD'2$  se define como el logaritmo negativo de la concentración de la droga metactoides, que causa un cambio en el efecto del agonista igual a la mitad del máximo cambio que puede ser causado por la droga metactoides en cuestión.

Ya que si  $\frac{E_A - E_{AB'_{max}}}{E_A - E_{AB'}} = 2$

el último término de la ecuación previa resulta 0.

Como  $\frac{E_A - E_{AB'_{max}}}{E_A - E_{AB'}}$  es independiente del valor  $E_A$ , es práctico usar en esta relación el  $E_{A_{max}}$ ,

ya que la ecuación anterior se transforma en:

$$pD'2 = -\log [B'] - \log \frac{(E_{A_{max}} - E_{A_{max}B'_{max}}) - 1}{E_{A_{max}} - E_{A_{max}B'}} \quad \text{Ec. 10}$$

si el compuesto metactoides es un antagonista completo  $E_{AB'_{max}}$ , es igual a cero.

La Figura 11 muestra las CCR de acetilcolina expuestas al antagonismo no competitivo de verapamil. El  $pD'2$  se calculó para cada una de las CCR individuales, finalmente promediando los valores.

Un método alternativo para calcular la  $K_{B'}$  de un antagonista no-competitivo es el **método de Gaddum**, que se basa en considerar el par de CCR en ausencia y presencia de una determinada concentración del antagonista  $B'$ , y a varios efectos iguales calcular la inversa de las concentraciones equiactivas del agonista en ausencia (A) y presencia (A') de  $B'$ . Graficando  $1/[A]$  versus  $1/[A']$  a varios efectos, se obtiene una recta con pendiente y ordenada positivas (Kenakin 2014).

Entonces, la  $K_{B'}$  del antagonista no-competitivo se calcula como:

$$K_{B'} = [B'] / (\text{pendiente} - 1)$$

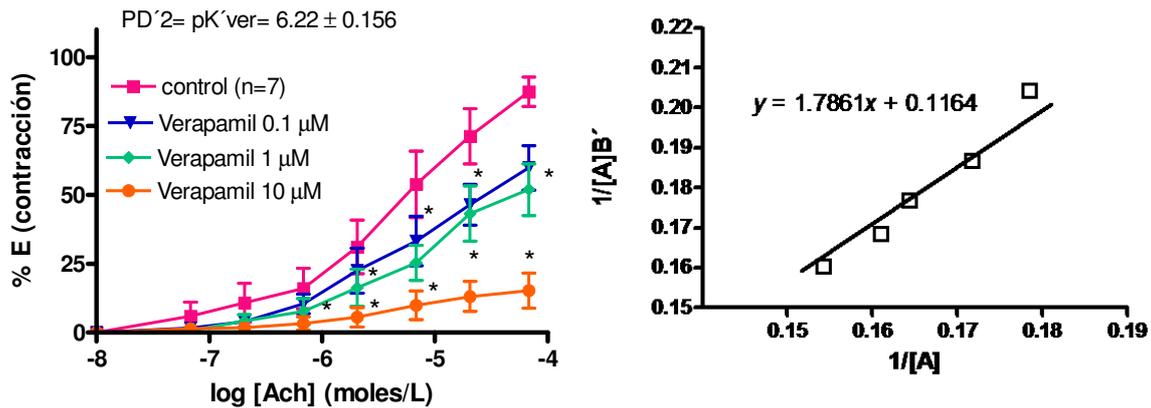


Figura 11: Antagonismo no competitivo: a) curvas concentración-respuesta (CCR) obtenidas en experimentos de nuestro laboratorio con intestino (íleon) aislado de rata en el que se efectuó contracción acumulativa por el agonista acetilcolina en ausencia y presencia de tres concentraciones del antagonista de los canales de calcio, verapamil. Observar que la CCR reduce sus efectos en forma proporcional a la  $[B']$ , siendo característico de un antagonismo metaoticoide o no competitivo. A partir de los  $E_{Amax}$  se calculó el  $pD'2 = pK_{B'}$  según se explica en el texto (Ec. 8). Los valores son independientes de la  $[B']$  y sólo tienen la variabilidad biológica, por lo cual se han promediado en este grupo de 7 experimentos. Las concentraciones del agonista se expresaron en molar, al igual que los parámetros extrapolados de  $pD2=pCE50$  de Ach ( $5,8 \pm 0,2$ ). Las concentraciones de los antagonistas (B) se expresaron en molar para el calculo de la afinidad  $pD'2$ . b) Correlación de Gaddum (ver texto).

## Métodos para la realización de las curvas concentración-respuesta

El tejido sobre el cual se van a estudiar las distintas sustancias, es acondicionado en una cuba de tamaño adecuado, termostatzado y aireado; un extremo del mismo es unido a un transductor de fuerza y se registra mediante amplificador a una computadora por adquisición analógica digital de la señal. En capítulos previos se explicaron las metodologías de medición de varios preparados.

### CCR acumulativas:

Una vez estabilizado el tejido en fuerza desarrollada durante unos 30 minutos, se aplica el método de CCR acumulativa, que es el método más rápido para realizar las curvas. Consiste en agregar una serie de concentraciones crecientes del agonista, registrando continuamente la contracción hasta que dos concentraciones sucesivas den similar efecto (efecto máximo,  $E_{Amax}$ ). Luego de la misma, el tejido se "lava" por remoción del agonista del medio. Después de un nuevo período de reposo y estabilización (generalmente 5-10 minutos), se podrá efectuar otra CCR.

El orden de CCR en cada preparado será: 2 o 3 CCR control (agonista solo), y sucesivas CCR del agonista en presencia de únicas y crecientes concentraciones del antagonista a eva-

luar. En cada preparado pueden hacerse unas 4 a 6 CCR con sendas concentraciones crecientes de antagonista.

La serie de concentraciones del agonista seguirá la secuencia: 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 o un múltiplo de ellos, porque garantiza que las diversas concentraciones barran el rango desde mínima a máxima respuesta, y se graficarán sencillamente en una escala logarítmica.

Para construir esa serie en la cuba, se deberá partir de otra serie para acumular. Por ejemplo, para acetilcolina, adrenalina, NA e isoproterenol empleamos la serie:

1 + 2 + 7 + 20 + 70 + 200 + 700 + 1000 + 2000 en  $\mu\text{g/ml}$ , agregados en la dilución 1/100 a la cuba, por lo cual resultará en las siguientes concentraciones en el tejido de la cuba:

0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10 – 20 – 40  $\mu\text{g/ml}$

Una vez hecho esto, se miden las respuestas. Los efectos se miden luego de trazar la línea de base previa al agregado del agonista, y en relación a ella. Se le dará valor 100% a la respuesta máxima del agonista en la CCR control, y las otras se calculan por comparación con aquella.

De esta manera determinamos el porcentaje de respuesta (%E) para cada concentración de agonista en ausencia o presencia del antagonista.

Finalmente las CCR se grafican como hemos mostrado en varias de las figuras de este capítulo, y se procede a calcular los parámetros correspondientes.

## Bibliografía

- Kenakin, T. P. (1984). The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacological Reviews* 36(3), 165-222.
- Kenakin, T. P. (2014). *A Pharmacology Primer*. 4<sup>th</sup> Edition. Amsterdam: Elsevier.
- Nieckerson, M. (1956). Receptors occupancy and tissular response. *Nature* 178, 697-698.
- Stephenson, R. P. (1956). A modification of receptor theory. *British Journal of Pharmacology* 11, 379-393.
- Van den Brink, F. G. (1977). General theory of drug-receptor interactions. Drug-receptor interaction models. Calculation of drug parameters. En *Kinetics of Drug Action*, by J.M. Van Rossum, pp 169-254, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Van Rossum, J. M. (1963). Cumulative dose-response curves. II Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Archives International Pharmacodynamics & Therapeutics* 143, 299-330.

# CATÍTULO 7

## Psicofarmacología: farmacodinamia y modelos experimentales

*Silvia Wikinski*

¿Qué es un **psicofármaco**? Esta pregunta puede ser respondida de muy diversas formas, pero hay quienes plantean que incluye un grupo de compuestos que ejerciendo su acción a nivel del sistema nervioso central son capaces de producir cambios en las funciones mentales superiores y en la conducta.

No se nos escapa que esta definición, así como está planteada, puede también incluir a otras sustancias con estas propiedades: los anestésicos generales, las drogas de abuso como cocaína o alcohol, las anfetaminas, y la lista sigue. Una definición más restrictiva sería aquella que identifica como psicofármacos a todas las drogas usadas para el tratamiento de los trastornos mentales.

Algunos de los usos de este grupo de sustancias exceden el marco estricto de la enfermedad mental ya que son prescritos para aliviar el sufrimiento ligado a situaciones de la vida diaria en personas sin enfermedad mental severa. Tal sería el caso del uso de psicofármacos para aliviar el insomnio ocasional o el miedo a situaciones puntuales como por ejemplo viajar en avión u otras del mismo tenor.

### **Una clasificación de los psicofármacos en base a sus acciones terapéuticas**

Se han propuesto varias clasificaciones para los psicofármacos, pero la más empleada se basa en agruparlos según sus principales usos terapéuticos. Así, se suelen identificar cuatro grupos: los antidepresivos, los ansiolíticos-hipnóticos, los antipsicóticos y los estabilizantes del estado del ánimo.

Estos grupos no son tan claros en la práctica clínica, ya que no es infrecuente el uso de antidepresivos para calmar la angustia, el de antipsicóticos para mejorar el estado del ánimo (por ejemplo la depresión), o el de algunos fármacos que pertenecen formalmente al grupo de los estabilizantes para disminuir la impulsividad. Estas indicaciones tienen un fundamento empírico que en muchos casos está muy firmemente establecido en la evidencia científica.

En este capítulo, sin embargo, vamos a usar la clasificación típica de los psicofármacos en cuatro grupos terapéuticos con fines de organización de la exposición. Lo anteriormente expresado tiene fundamentalmente como objetivo alertar al estudiante acerca de la variabilidad de usos que se da a los distintos psicofármacos para evitar la estigmatización de quienes los necesitan o la deducción inadecuada de un diagnóstico a partir de la prescripción que recibe.

## Una aproximación epistemológica al tema

El descubrimiento de estos fármacos fue esencialmente serendípico. Alrededor de 1950 por distintas observaciones casuales se identificaron moléculas que ejercían efecto antidepresivo (la imipramina o la iproniazida), antimaníaco (las sales de litio) o antipsicótico (la clorpromazina). Con esto queremos señalar que el estudio de los mecanismos de acción fue a posteriori del descubrimiento de sus acciones terapéuticas.

El estudio de los efectos biológicos que estas sustancias ejercen a nivel del cerebro abrió simultáneamente dos campos que desde entonces dialogan incesantemente: el de su mecanismo de acción y el de la fisiopatogenia de las enfermedades para las cuales resultan eficaces. Los psicofármacos se transformaron entonces en herramientas para formular hipótesis etiopatogénicas de los trastornos mentales.

Debemos señalar, sin embargo, que el razonamiento que vincula de manera directa el efecto biológico de un compuesto con las alteraciones que subyacen al padecimiento para el cual se emplea adolece de algunas debilidades. Pongamos un ejemplo: el de los antidepresivos.

Muy poco tiempo después de que se hubiera descrito la eficacia antidepresiva de la imipramina se supo que ejercía inhibía la recaptación de monoaminas. La deducción que de esta observación se hizo fue que en la depresión había una disminución de monoaminas en la brecha sináptica, deducción que no pudo ser corroborada posteriormente.

El modelo de razonamiento descrito es heredero de la infectología, posiblemente una de las primeras ramas de la Medicina en las cuales la etiología pudo establecerse con bases científicas. Pero nada indica que la etiopatogenia de las enfermedades mentales sea tan simple, si se nos permite, como la de las enfermedades infecciosas. El sistema nervioso central funciona en red y posee formas de regulación que nos son en gran medida desconocidas. Es muy poco factible que se cumpla la hipótesis de “un neurotransmisor-una enfermedad” como se ilusionaron los primeros neurocientíficos del siglo XX (ver un desarrollo de esta idea en Wikinski, 2011).

Hechas estas aclaraciones epistemológicas, a continuación brindaremos un sucinto resumen de cuáles son los medios de los que nos valemos los neurocientíficos para explorar tanto las posibles acciones terapéuticas como los mecanismos de acción de los psicofármacos. Lo haremos respetando los cuatro grupos terapéuticos: modelos de depresión, de esquizofrenia (una forma de psicosis), de ansiedad y de trastorno bipolar.

## **Modelos experimentales para el estudio de las enfermedades psiquiátricas o de la acción de los psicofármacos**

Idealmente, hay tres condiciones que debe reunir un modelo experimental para justificar su uso y refrendar la utilidad de los resultados que de él se desprenden: validez de constructo, validez de apariencia y validez predictiva.

La **validez de constructo** se refiere a la que se logra recreando experimentalmente las condiciones que dan lugar a la enfermedad en el ser humano. Un ejemplo de esto sería la inoculación de un germen patógeno para recrear una enfermedad infecciosa, o la destrucción de los islotes de Langerhans para recrear un modelo de diabetes tipo I. Dado que, como señalamos más arriba, la etiología de las enfermedades mentales permanece aún oscura en su mayor parte, podríamos decir que no contamos con modelos que satisfagan esta condición. Hay, sin embargo, muchos modelos que recrean condiciones que en la clínica se han visto asociadas al desencadenamiento de trastornos mentales. Ejemplo de ello son los modelos que se valen de la exposición crónica al estrés para desencadenar modelos de depresión en roedores.

La **validez de apariencia** se refiere a la fidelidad con que el modelo reproduce aspectos conductuales, bioquímicos, morfológicos o neurofisiológicos de la enfermedad en el ser humano. Algunos de los modelos disponibles, especialmente los de depresión o ansiedad, mimetizan razonablemente las alteraciones halladas en el hombre. Lo discutiremos con más detalle más adelante.

La **validez predictiva** significa que el modelo responde a los tratamientos en un modo que predice los efectos de estos tratamientos en los seres humanos.

## **Reflexiones éticas en torno al uso de animales para el estudio en psicofarmacología o psicopatología**

En todo el mundo hay una creciente preocupación por atender las condiciones éticas que rodean al empleo de animales para estudios de fisiología, farmacología o fisiopatología en general. Esto se aplica, desde luego, al empleo para el estudio de enfermedades mentales, condiciones que se caracterizan por presentar sufrimiento psíquico y para el descubrimiento y la validación de nuevas estrategias terapéuticas.

La Asociación Internacional de Evaluación y Acreditación para el Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC) recomienda el uso de la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio (8va edición, 2011) elaborada por la National Academy of Science, de los Estados Unidos de América. En ella se refrenda el principio de las 3Rs: reemplazo, refinamiento y re-

ducción, que se refieren a reemplazar el animal de experimentación por otro método siempre que esto sea posible, refinar los métodos para obtener el máximo beneficio experimental con el menor sufrimiento de los animales y reducir al mínimo el número de animales haciendo un cálculo racional del tamaño de los grupos. Resumimos a continuación los principios definidos en el mencionado documento.

- Los procedimientos que involucran animales deben ser diseñados y llevados a cabo habiendo considerado su relevancia para el avance del conocimiento sobre la salud humana o animal o para el bien de la sociedad
- Los animales seleccionados para un procedimiento deben ser de la especie y la calidad adecuada y el número debe ser el mínimo para obtener resultados válidos. Debe considerarse la posibilidad de emplear en su reemplazo modelos matemáticos, simulación por computadora o sistemas biológicos in vitro.
- Debe evitarse o minimizar la incomodidad, el estrés y el dolor. Los investigadores deben considerar que los procedimientos que causan discomfort, estrés o dolor a los seres humanos también lo hacen a los animales.
- Siempre que se pueda deberá usarse sedación, analgesia o anestesia.
- Los animales que pudieran sufrir dolor crónico o severo o estrés que no pudiera ser aliviado deben ser sacrificados sin sufrimiento al final del procedimiento o, si es posible, durante el procedimiento.
- Las condiciones de alojamiento de los animales deben ser adecuadas e idealmente dirigidas por un veterinario u otro científico entrenado y experimentado en el cuidado y manejo de animales de laboratorio. Debe proporcionarse cuidado veterinario.
- Los investigadores y el personal involucrado deben contar con calificación para la tarea.
- Pueden considerarse excepciones a estos principios, pero las mismas no se aplican a procedimientos destinados únicamente al entrenamiento de personal o a la enseñanza.

## **Modelos experimentales de depresión**

### **Modelos con validez de apariencia basados en la exposición a estrés**

Dada la relación reiteradamente informada entre la exposición al estrés y el desencadenamiento de episodios depresivos en seres humanos, un recurso empleado para generar modelos experimentales de depresión es exponer a roedores a distintas modalidades de situaciones estresantes. Todos estos modelos comparten una validez de apariencia razonable ya que los animales muestran alteraciones conductuales que mimetizan las observadas en personas que sufren de depresión.

Se aceptan las siguientes equivalencias, en las que se apoyaría la indicada validez de apariencia entre los modelos experimentales de depresión basados en la exposición a estrés y los cuadros de depresión en seres humanos:

**Tabla 1: Correlación entre cuadros de depresión y modelos experimentales.**

<b>Seres humanos</b>	<b>Roedores</b>
<b><i>Fenotipo psicológico/conductual</i></b>	
Anhedonia o dificultad para experimentar placer	Disminución del consumo de soluciones azucaradas
Desesperanza	Falta de conducta de escape ante situaciones de estrés
Alteraciones del sueño	Alteraciones de los patrones de sueño medidos por electroencefalografía
Alteraciones del apetito y del peso corporal	Disminución del consumo de alimentos y descenso de peso
<b><i>Aspectos anatómicos y bioquímicos</i></b>	
Disminución del volumen del hipocampo, medida por resonancia magnética nuclear	Disminución del volumen del hipocampo, atrofia de dendritas apicales en neuronas del giro dentado, disminución de espinas dendríticas
Alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	Alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
<b><i>Efecto de antidepresivos</i></b>	
El tratamiento crónico pero no el agudo produce mejoría sintomática, revierten los cambios hormonales y algunas evidencias indicarían que previenen la atrofia hipocampal	El tratamiento crónico y no el agudo revierte las alteraciones conductuales, hay evidencias parciales de que corrigen las alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis adrenal y previenen la atrofia de las neuronas del hipocampo

### **Breve descripción de los modelos basados en la exposición a estrés**

- **Desafío social crónico:** consiste en forzar relaciones de subordinación colocando una rata o ratón en una jaula en la que hay un macho dominante. Este procedimiento genera un fenotipo tipo depresivo como el que se indica en el Cuadro 1 que se revierte con el tratamiento crónico con antidepresivos.
- **Estrés crónico moderado e impredecible:** consiste en exponer a ratas o ratones a distintas situaciones de estrés que no comporta riesgo de vida (jaula sucia, luces encendidas durante la noche, ausencia de alimento durante 12 horas, privación de agua durante periodos breves de tiempo, colocación de la jaula en un plano inclinado, etc.). Estos estímulos estresantes se alternan de manera aleatoria, de manera de evitar la habituación. El protocolo dura en general al menos 3 semanas, al cabo de las cuales se puede observar disminución en la preferencia por soluciones apetitivas (conteniendo sacarina o sacarosa), del sueño, del ritmo circadiano en la secreción de cortisol. Estas

alteraciones se previenen si los animales reciben tratamiento con antidepresivos durante la exposición al estrés. Algunos autores demostraron incluso reversión de las alteraciones ya instaladas por el tratamiento crónico con antidepresivos.

- **Modelo de desesperanza aprendida:** consiste en exponer a ratas adultas a una situación de estrés que no puede ni controlar ni de la que se puede escapar (usualmente es un shock eléctrico leve a través de una grilla en la que está parada). Exposiciones subsiguientes inducen fallas de escape que se pueden contabilizar en latencia para huir de un estímulo semejante o ausencia de conducta de huida. El tratamiento crónico, pero no el agudo, con antidepresivos restablece la conducta de escape.

### **Modelos con validez predictiva**

Un modelo muy útil para predecir la eficacia de compuestos potencialmente antidepresivos es el de **natación forzada**. Este modelo consiste en colocar al animal en un cilindro de por lo menos 30 cm de profundidad, lleno con agua a temperatura a 30°C y cuantificar el porcentaje de tiempo que ejecuta movimientos de escape (nadar o intentar trepar por las paredes). El porcentaje de tiempo que permanece inmóvil, conducta que se considera que mimetiza la de desesperanza descrita en el apartado anterior disminuye si el animal recibió una única dosis de un antidepresivo entre 30 minutos y 24 horas antes.

Se dará cuenta el lector que este modelo carece de validez de apariencia, ya que en seres humanos el tratamiento agudo con antidepresivos carece de eficacia terapéutica. Sin embargo, es muy útil como modelo de tamizaje de drogas con potencialidad antidepresiva, ya que otros psicofármacos de acción central carecen de actividad en la prueba.

### **Modelos experimentales de esquizofrenia**

La esquizofrenia es una enfermedad generalmente muy discapacitante que se caracteriza por presentar tres grupos de síntomas: los positivos (alucinaciones y delirios), los negativos (aplanamiento emocional, falta de motivación, aislamiento social) y los cognitivos (alteraciones en la cognición social y en la memoria de trabajo). Aunque hay evidencia de cierta carga genética asociada a la presencia de la esquizofrenia, no se ha podido establecer cuál es el patrón de asociación entre factores genéticos y ambientales que predispone al desencadenamiento de la enfermedad.

En condiciones de laboratorio las personas con esquizofrenia presentan también fallas en la inhibición prepulso. En sujetos control la exposición a un estímulo sensorial leve generalmente inhibe la respuesta a un estímulo más intenso, siempre que el periodo entre uno y otro sea del orden de los milisegundos. Esta inhibición de la respuesta al segundo estímulo no se observa en personas con esquizofrenia y se considera un indicador de alteraciones en las compuertas sensoriales a nivel de las vías cortico-estriado-talámicas.

El tratamiento con antipsicóticos en general resulta eficaz para disminuir los síntomas positivos y las fallas en la inhibición prepulso pero los síntomas negativos y los cognitivos no hallaron aún alivio a través de la farmacoterapia. Como la discapacidad en las personas que sufren esquizofrenia guarda estrecha relación con la intensidad de los síntomas negativos y cognitivos, la investigación en este terreno reviste enorme interés.

### **Modelos obtenidos por manipulación genética**

Estudios en familias en las que varios miembros están afectados por la enfermedad permitió identificar algunas mutaciones con alta penetración que fueron luego trasladadas a ratones transgénicos, en la esperanza de contar con modelos con validez de constructo. Entre los genes cuya mutación se reprodujo están *Disc1* (*Disrupted in schizophrenia 1*), microdeleciones puntuales en el cromosoma 22q11.2, cambios de una valina por una metionina en el gen que codifica para la enzima catecol-O-metiltransferasa, cambios dirigidos en la subunidad NR1 del receptor NMDA presente en neuronas GABAérgicas corticales e hipocampales, entre otras. Este último desarrollo resulta particularmente interesante, dada no solo su potencial validez de constructo, basada en el efecto psicótico mimético que ejercen los antagonistas NMDA en seres humanos (tema al que nos referiremos enseguida) sino también de apariencia. Los ratones desarrollados bajo esta premisa reúnen características conductuales que evocan los síntomas negativos y cognitivos de las personas con esquizofrenia así como alteración en la inhibición prepulso. El efecto de drogas antipsicóticas sobre estos ratones le confiere al modelo también validez predictiva (Belforte y col., 2010; Gilmour y col., 2012; Nakazawa y col., 2013).

### **Modelos de esquizofrenia basados en la administración de drogas**

- **Modelo basado en la administración de anfetamina:** Sobre la base de que los antipsicóticos clásicos bloquean los receptores dopaminérgicos tipo 2 (D2), se desarrollaron modelos en los que la hiperactividad de estos receptores era inducida farmacológicamente. De los diversos ensayos realizados el que actualmente persiste es el que consiste en la administración de anfetamina, un compuesto que facilita la liberación la acción postsináptica de dopamina en los circuitos mesolímbico y mesocortical. Los animales presentan un aumento de la locomoción y fallas en la inhibición prepulso que se corrigen con la administración de drogas antipsicóticas, por lo que se acepta que el modelo tiene validez predictiva adecuada (Cantrup y col. 2012; Hagan & Jones, 2005)
- **Modelo basado en la administración de antagonistas NMDA:** La administración de antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA, algunos de los cuales son drogas de abuso como la ketamina o la dizocilpina (también llamada “polvo de ángel”), producen en seres humanos un cuadro clínico que resulta indistinguible de un episodio agudo de esquizofrenia. Por ese motivo, se propuso un modelo consistente en la administración de bloqueantes NMDA. Al igual que lo referido con respecto a la anfetamina, este procedimiento produce un aumento de la actividad lo-

comotora y fallas en la inhibición prepulso que revierten con antipsicóticos. Adicionalmente, en nuestro laboratorio demostramos fallas en la memoria de trabajo empleando como variable de estudio el desempeño en un laberinto en T (Beraki y col. 2009; Kos y col. 2011).

## **Modelos experimentales de ansiedad**

La angustia es una emoción humana normal. Es la respuesta no solo habitual sino deseable ante situaciones de peligro, ya que promueve conductas autoprotectoras y de cuidado. Sin embargo, en algunas situaciones, esta señal de alerta resulta desproporcionada en su intensidad o inadecuada en su aparición y en consecuencia, disfuncional para el desempeño personal y el bienestar subjetivo. Esas son las circunstancias que justifican un tratamiento, ya sea este farmacológico, psicológico o una combinación de ambos.

El uso de fármacos para el alivio de la angustia en sus formas patológicas o disfuncionales, es frecuente. El desarrollo de modelos experimentales de ansiedad (no podemos en este caso hablar de angustia porque la angustia, en tanto síntoma subjetivo, es imposible de conocer en especies no humanas) permite por un lado conocer con mayor profundidad las bases neurobiológicas de los trastornos que la presentan, y por el otro identificar la potencialidad ansiolítica de nuevos compuestos.

Hay esencialmente dos tipos de modelos de ansiedad, los que tienen fundamento etológico (no requieren condicionamiento) y los que requieren manipulaciones específicas para generar la respuesta de miedo o de ansiedad.

### **Modelos de ansiedad con fundamento etológico**

Estos modelos se basan en respuestas intuitivas a desafíos ambientales y por lo tanto, se acepta que reflejan con bastante validez de apariencia e incluso de constructo lo que nos sucede a los seres humanos. Su racionalidad consiste en emplear una tensión natural que existiría en los roedores entre curiosidad por un espacio novedoso y temor a las consecuencias que puede tener exponerse a él (ver Revisión de Campos y col., 2013).

- **Laberinto elevado en cruz:** el aparato en que esta prueba se realiza consiste en dos corredores colocados en cruz, dos de cuyos brazos tienen paredes y los otros dos no. El balance entre curiosidad y temor se da por la tendencia exploratoria natural de los roedores y, al mismo tiempo, su temor a transitar por espacios sin reparo físico (paredes por ejemplo). La conducta natural muestra una preferencia por los brazos cerrados o con paredes mientras que el tratamiento con drogas ansiolíticas hace que dicha preferencia disminuya.
- **Caja de transición luz-oscuridad:** Al igual que en la prueba descrita en el párrafo anterior, el conflicto que propone esta prueba es por un lado la preferencia de los roedores por un espacio oscuro y por el otro la tendencia natural a la exploración. El

aparato en que se lleva a cabo es una caja dividida en dos compartimentos, uno iluminado y el otro oscuro, separados por una abertura de libre tránsito. Intuitivamente, los animales colocados en un espacio iluminado tienden a explorar el oscuro y a pasar más tiempo en este último. El tratamiento con ansiolíticos hace que esta diferencia se reduzca y aumenten los pasajes a través de la puerta que separa ambos espacios.

- **Plancha con agujeros (*hole board test*):** Al igual que en los anteriores, esta prueba explora la resolución del conflicto entre exploración de los agujeros de una plancha que oficia de piso para los animales y la percepción de miedo que estos espacios huecos generan. El aparato es una plancha con agujeros que permiten que el roedor coloque su cabeza, colocado a distancia del piso. La tendencia innata de explorar lo que hay bajo los agujeros de la plancha, ejecutada metiendo la cabeza por los agujeros, se contrapone con el riesgo potencialmente percibido por la altura y lo que pueda haber bajo la plancha. El efecto de ansiolíticos aumenta la exploración de los roedores, cuantificada como número de veces que el animal ingresa su cabeza por los agujeros.
  - **Prueba de interacción social:** Esta prueba consiste en evaluar las interacciones sociales entre dos ratones o dos ratas colocados en un espacio común. Ambos animales son evaluados y se cuantifica tanto el número de intercambios como las características de los mismos. El tratamiento con ansiolíticos a uno de ellos facilita la interacción de este con el compañero.

### **Pruebas basadas en el miedo condicionado**

A diferencia de las pruebas descritas en el apartado anterior, las que ahora describiremos requieren manipulación previa por parte del experimentador. Esta manipulación tiene por finalidad inducir en el animal una experiencia que asocie una conducta instintiva con un peligro: beber agua con recibir un estímulo aversivo, por ejemplo. Por ese motivo, en términos generales, estas pruebas se llaman “de conflicto” o de “miedo condicionado”. En todas ellas los ansiolíticos disminuyen la respuesta de miedo, facilitando por lo tanto la conducta que se asoció al riesgo (ver Revisión de Campos y col., 2013).

- **Prueba de Vogel o test del conflicto:** En esta prueba animales privados de alimento por 24 horas son entrenados para recibir una solución endulzada cuando presionan una palanca. En una sesión posterior se introduce un estímulo que anuncia que al presionar la palanca para recibir la recompensa recibirá también un shock eléctrico (leve en intensidad). Los ansiolíticos clásicos facilitan la conducta de búsqueda de recompensa a pesar de que el animal está advertido por el estímulo lumínico que simultáneamente recibirá el shock eléctrico.
- **Prueba de miedo condicionado:** Este procedimiento se inscribe en los derivados de las observaciones de Pavlov. Consiste en asociar un estímulo neutro (puede ser un sonido, una luz, un puff de aire) a un estímulo aversivo como por

ejemplo un leve shock eléctrico. En lo sucesivo, la exposición al estímulo neutro (estímulo no condicionado) induce una respuesta de miedo (respuesta condicionada). El modelo reproduce en cierta medida el miedo o la angustia consecutiva a la exposición a situaciones traumáticas que se observa en el trastorno de estrés postraumático. Si el tratamiento con ansiolíticos se administra entre el estímulo neutro y el condicionante, la memoria traumática no se instala. Pero una vez instalada el tratamiento no solo con ansiolíticos benzodiazepínicos sino también con antidepresivos del grupo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, abordajes todos ellos útiles en la clínica del estrés postraumático, disminuyen la respuesta de miedo condicionado. Vemos entonces que este modelo es consistente y posee validez de constructo, de apariencia y predictivo para el trastorno de estrés postraumático. Debemos advertir, sin embargo, que en la bibliografía hay un debate acerca de si el tratamiento con antidepresivos debe o no ser crónico, lo que en caso de no ser un requisito debilitaría su validez predictiva.

## **Modelos experimentales de trastorno bipolar**

El trastorno bipolar, anteriormente llamado enfermedad o psicosis maníaco-depresiva, es una patología del estado del ánimo. El cuadro clínico consiste en una inestabilidad afectiva con oscilaciones del humor entre el polo depresivo y el polo maníaco, con o sin periodos libres de síntomas entre uno y otro. Admite múltiples presentaciones clínicas, con predominio tanto de uno u otro polo, alternancias de distintos estados de ánimo en poco tiempo o con periodos interepisódicos prolongados y funcionamiento sociolaboral adecuado mientras estos duren.

El tratamiento farmacológico atenúa tanto la intensidad como la frecuencia de los episodios afectivos y hoy en día, sobre la base de muy abundante evidencia científica, es el principal abordaje terapéutico. Los fármacos indicados pertenecen al grupo de los estabilizadores del ánimo e incluyen el ácido valproico, la carbamezepina, la lamotrigina y las sales de litio. El perfil de acción de cada uno de estos compuestos es distinto y por lo tanto, los modelos experimentales pueden tener validez predictiva para uno u otro, pero no necesariamente para todo el grupo de estabilizantes. Esta situación constituye una dificultad experimental considerable a la hora de buscar y validar modelos experimentales de la enfermedad.

El modelo más empleado en roedores consiste en la administración de psicoestimulantes, los que inducen un cuadro de agitación e hiperlocomoción que remeda un episodio maníaco. Este modelo tiene validez predictiva para los principales compuestos antimaníacos, el litio o ácido valproico.

Al ser una enfermedad que se manifiesta con más frecuencia en familiares en primer grado de personas que la padecen que en la población general, se acepta la existencia de

componentes genéticos o epigenéticos en su etiopatogenia. Sin embargo ninguno de los hallazgos publicados hasta el momento dio lugar a un modelo consistente a partir de manipulaciones en este nivel.

## **Farmacodinamia aplicada a la psicofarmacología**

El estudio de los mecanismos de acción de los psicofármacos se ha basado fundamentalmente en la aplicación de los métodos que fueron desarrollando las neurociencias a animales tratados con los compuestos. Así, a medida que la ciencia evoluciona y cuenta con nuevos recursos y conocimientos se investiga si los psicofármacos modifican o no los nuevos parámetros descriptos. Para poner un ejemplo, cuando el auge de las neurociencias estaba centrado en los neurotransmisores y la regulación de su liberación y recaptación, se aplicaron estos hallazgos a los antidepresivos y se demostró que los mismos modificaban la recaptación de monoaminas. Pero más adelante, al descubrirse las neurotrofinas, la neurogénesis adulta o los cambios epigenéticos en respuesta a distintos estímulos, pudo saberse que también estos fenómenos acompañaban el tratamiento con los antidepresivos. Vemos entonces que el estudio de los mecanismos por los cuales los psicofármacos ejercen su acción está aún en plena evolución. Los apartados que siguen resumen el estado del conocimiento a la fecha.

### **Mecanismos de acción de los antidepresivos**

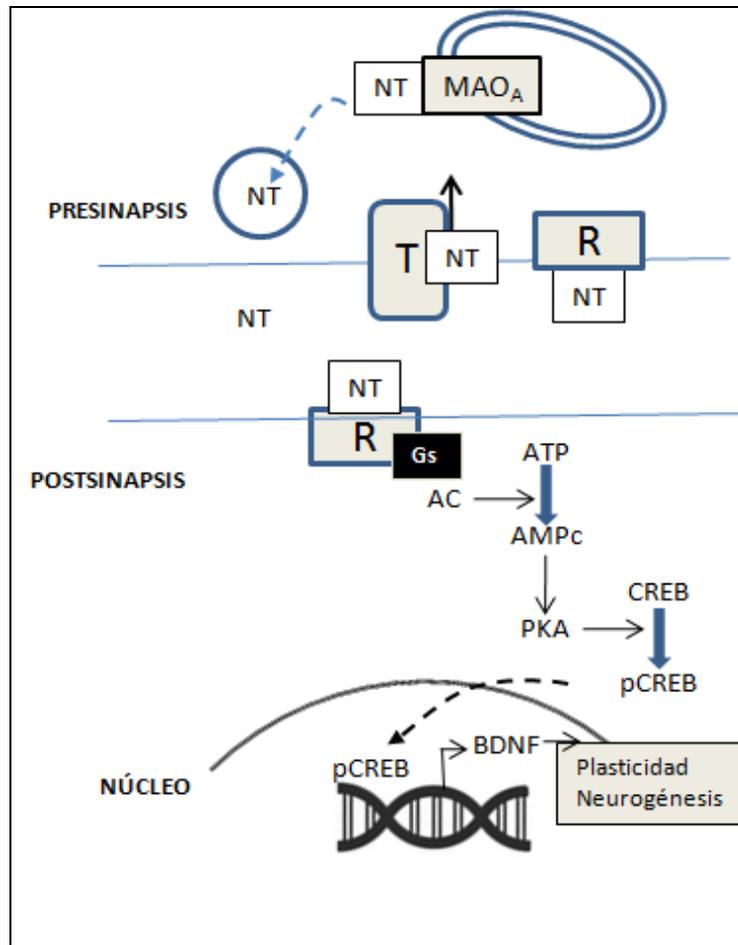
A la fecha hay más de 20 antidepresivos en uso clínico. Si bien puede haber diferencias en su mecanismo inicial de acción, todos comparten mecanismos intracelulares, que se creen son los que explican sus propiedades terapéuticas.

La hipótesis más difundida y aceptada es que el mecanismo inicial de acción de todos los antidepresivos consiste en modificar la actividad monoaminérgica en los receptores postsinápticos de neuronas ubicadas en zonas del cerebro que participan en el control emocional como el núcleo accumbens, el hipocampo, la amígdala, y la corteza media prefrontal.

A partir de este mecanismo inicial de acción se desencadenan acciones a más largo plazo, las que en verdad serían responsables del efecto terapéutico. Esto se sustenta en el hecho de que todos los antidepresivos disponibles tienen una latencia de 2 a 3 semanas para el inicio de su acción.

Entre las acciones mediatas, que dependerían a su vez de las iniciales a nivel de las monoaminas, se encuentran la activación de segundos mensajeros en la vía del AMPc, lo que llevaría al aumento de la actividad de la proteinkinasa A (PKA), la que fosforila la proteína CREB, la que traslocada al núcleo induce la síntesis del factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor* o BDNF). Esta neurotrofina tiene diversas acciones sobre la plasticidad sináptica: facilita la neurogénesis en áreas del cerebro en las que persis-

ten células indiferenciadas con capacidad de transformarse en neuronas maduras, estimula la sinaptogénesis y la formación de espinas dendríticas (ver Revisión de Duman, 2009). La **Figura 1** ilustra esta cascada de eventos.



**Figura 1:** Los fármacos antidepresivos actúan sobre receptores a monoaminas, tanto pre como postsinápticos. El resultado inmediato es una modificación en el balance de actividad a nivel de receptores, fenómeno que en el mediano plazo modifica la actividad a nivel de segundos mensajeros y vías de señalización acopladas.

**Referencias:** AC = adenilato ciclasa; AMPc= Adenosin Monofosfato cíclico; ATP = Adenosin Trifosfato; BDNF= factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain derived Neurotrophic Factor*). CREB = elemento de respuesta a AMPc (*cAMP element response binding*); MAO = monoaminooxidasa; NT= neurotransmisor; pCREB = fosfo CREB ; R = receptor; T = transportador

Las diferencias entre los distintos antidepresivos en uso clínico radica en la acción inicial sobre receptores monoaminérgicos, ya que los hay que solo inhiben la recaptación de una monoamina, los que también actúan sobre receptores pre o postsinápticos, los que actúan sobre varios sistemas de neurotransmisión monoaminérgica y los que además de estas acciones, actúan sobre otros sistemas como el colinérgico o el histaminérgico.

La **Tabla 2** resume las acciones de los antidepresivos sobre la neurotransmisión monoaminérgica.

**Tabla 2: Acciones de los antidepresivos sobre la neurotransmisión monoaminérgica**

Antidepresivo	Acción monoaminérgica inicial	Otras acciones sobre neurotransmisores
Fluoxetina Paroxetina Sertralina Citalopram Escitalopram Fluvoxamina	Inhibición de la recaptación de serotonina	---
Venlafaxina Desvenlafaxina Duloxetina Milnacipram	Inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina	---
Mirtazapina	Antagonista de los receptores 5HT <sub>2A</sub> , 5HT <sub>3</sub> y $\alpha$ 2	Antagonista H <sub>1</sub>
Mianserina	Antagonista de los receptores $\alpha$ 2, $\alpha$ 1, 5HT <sub>2A</sub> y 5HT <sub>3</sub>	Antagonista H <sub>1</sub>
Trazodona	Antagonista 5HT <sub>2A</sub>	Antagonista H <sub>1</sub>
Amitriptilina Imipramina Desimipramina Nortriptilina	Inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina	Bloqueo de los receptores histaminérgicos H <sub>1</sub> y de los receptores muscarínicos
Bupropion	Inhibición de la recaptación de dopamina y noradrenalina	---
Tranilcipromina	Inhibición de la MAO	---
Reboxetina	Inhibidor de la recaptación de noradrenalina	---
Vortioxetina	Inhibición de la recaptación de serotonina, antagonista del receptor 5HT <sub>3</sub> , antagonista del receptor 5HT <sub>7</sub> , agonista parcial del receptor 5HT <sub>1B</sub> y agonista del receptor 5HT <sub>1A</sub> .	---

**Referencias:** 5HT = serotonina, MAO = monoaminoxidasa,  $\alpha$  = receptor  $\alpha$  adrenérgico, H= receptor a histamina

## Mecanismos de acción de los antipsicóticos

La indicación principal, aunque no la única, de los antipsicóticos es el tratamiento de la esquizofrenia. Esta enfermedad se presenta con una variedad de síntomas, de intensidad diversa de paciente a paciente, que incluyen los así llamados síntomas positivos (delirios y alucinaciones), negativos (apatía, aislamiento social, falta de espontaneidad, aplanamiento emocional), cognitivos (alteraciones en la cognición social, en la memoria de trabajo y en la capacidad de razonamiento), afectivos dentro del espectro depresivo/ansioso y de la conducta (agresión u hostilidad). La capacidad de los antipsicóticos de los que disponemos actualmente para producir mejoras en estas dimensiones sintomáticas es variable, aunque hay consenso acerca de la muy escasa eficacia para incidir positivamente en los síntomas negativos y cognitivos. Los síntomas positivos, los afectivos y la hostilidad pueden responder favorablemente al tratamiento con estos fármacos.

Los antipsicóticos se clasifican por su potencialidad para producir síntomas extrapiramidales e hiperprolactinemia en **típicos** y **atípicos**, siendo estos últimos los que con menor probabilidad inducen estos efectos adversos. A poco de la identificación de las primeras moléculas con eficacia antipsicótica, y en pleno auge del método de unión ligando/receptor para estudiar la farmacodinamia de distintas drogas (Wikinski, 2008), se pudo constatar que había una estrecha correlación entre la potencia para bloquear los receptores dopaminérgicos  $D_2$  y la potencialidad de los antipsicóticos para producir síntomas extrapiramidales, lo que por otro lado resulta muy coherente con la hipótesis dopaminérgica de la etiología de la enfermedad de Parkinson, una de las hipótesis etiológicas más exitosas de la neurología contemporánea. Igualmente, parecía que había una correlación positiva entre potencia antipsicótica y la potencia para bloquear los receptores  $D_2$ , lo que dio lugar a la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia, la que con cambios sigue aún vigente (Howes & Kapur, 2009). Si bien la evolución de la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia excede los objetivos de este capítulo destinado fundamentalmente a los mecanismos de acción de los psicofármacos, solo para alertar a sus lectores debemos señalar que las nuevas hipótesis matizan esta perspectiva con el análisis de los papeles que tienen la hipodopaminergia cortical, la modificación de la neurotransmisión glutamatérgica, mecanismos asociados a la neuroinflamación y a la presencia de citoquinas proinflamatorias. en el desencadenamiento de esta enfermedad (Poels y col., 2014; Watkins & Andrews, 2015).

## Diferencias en el mecanismo de acción de los antipsicóticos típicos y atípicos

En los años `80 desde la perspectiva farmacodinámica, la única excepción a la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia parecía ser la clozapina, un antipsicótico eficaz aún en pacientes que no respondieron al tratamiento con antipsicóticos típicos, y que no cumplía la premisa de “a mayor potencia de bloqueo  $D_2$  mayor efecto antipsicótico”. Justamente el perfil farmacodinámico de la clozapina orientó hacia un nuevo camino en el estudio de los antipsicóticos, en el que se dio importancia al bloqueo de los receptores  $5HT_{2A}$  o a la relación bloqueo  $D_2$ /bloqueo  $5HT_{2A}$ .

Más tarde, se agregaron nuevas perspectivas que buscan explicar la acción antipsicótica de los fármacos atípicos. Hoy las tres teorías prevalentes pueden sintetizarse de la siguiente manera (para más detalles puede consultarse la revisión de Mauri y colaboradores (2014):

- **Teoría dopaminérgica “fast-off  $D_2$ ”:** Esta teoría propone que los antipsicóticos típicos se unen al receptor  $D_2$  con una constante de disociación menor que la de los atípicos. De esta forma, la competencia de la dopamina endógena por su unión al receptor del tipo 2 sería más eficaz en los atípicos que en los típicos, explicándose así el mejor

---

<sup>1</sup> Nota de la autora: “fast-off” podría ser traducido como “apagado rápido” pero se elige su expresión en inglés por lo muy frecuentemente empleada en la literatura.

perfil de aquellos en las vías dopaminérgica nigroestriatal y tuberoinfundibular, niveles en los que el bloqueo  $D_2$  ocasiona los síntomas extrapiramidales y la hiperprolactinemia respectivamente.

- **Antagonismo  $5HT_{2A}/D_2$ :** esta teoría se basa en el análisis comparativo de la potencia de bloqueo de los receptores a serotonina  $5HT_{2A}$ , dopaminérgicos  $D_2$  entre los antipsicóticos típicos y los atípicos. Propone que los atípicos tienen mayor potencia de bloqueo  $5HT_{2A}$  que dopaminérgico y que el bloqueo dopaminérgico que ejerce este grupo de fármacos es menor al que ejercen los fármacos típicos. A nivel del sistema nigroestriado, el bloqueo  $5HT_{2A}$  facilitaría la liberación de dopamina que de esta forma competiría con el antagonismo  $D_2$ , reduciendo entonces los efectos adversos extrapiramidales.
- **Inducción de neuroplasticidad:** Esta última teoría, consistente con hallazgos experimentales en animales de experimentación, señala la superioridad de los antipsicóticos atípicos para inducir fenómenos de neuroplasticidad en áreas críticas del sistema nervioso central. Debemos sin embargo señalar que si bien los efectos sobre factores tróficos cerebrales como BDNF o NGF han sido estudiados y demostrados para los antipsicóticos atípicos no es tan claro que los antipsicóticos típicos no los induzcan, ni tampoco es evidente la relación entre estos efectos a nivel celular y el efecto terapéutico que ejercen.

La **Tabla 3** resume las acciones de los antipsicóticos actualmente en uso clínico sobre distintos sistemas de neurotransmisión. Para hacer inteligible los perfiles clínicos de los distintos fármacos se agrega en cada caso una enumeración de sus efectos tanto terapéuticos como adversos. Recomendamos a los lectores que presten atención a dos aspectos de la acción clínica, independientes del efecto antipsicótico propiamente dicho: el efecto sedativo y la facilidad para promover el aumento de peso. El primero puede ser de utilidad cuando el cuadro psicótico se acompaña de insomnio y agitación mientras que el segundo es un efecto adverso que deberá vigilarse porque incrementa significativamente el riesgo cardiovascular de las personas con esquizofrenia, las que de por sí tienen una expectativa de vida menor a la de la población general. Por último, permítasenos señalar que los fármacos en los que el balance de bloqueo  $D_2/5HT_{2A}$  es mayor pueden producir un síndrome, llamado “neuroléptico” por Delay y Deniker en los albores de la era psicofarmacológica (Delay & Deniker, 1952), compuesto de enlentecimiento psicomotor, indiferencia afectiva y tranquilidad emocional. Este síndrome puede acentuar el aislamiento social y la discapacidad de las personas con esquizofrenia.

**Tabla 3:** Acciones de los antipsicóticos típicos y atípicos sobre los sistemas de neurotransmisión y su asociación con efectos terapéuticos y adversos. Elaborada con datos extraídos de Mauri y cols. (2014), Miyamoto y cols. (2005), Jufe (2006) y Meyer (2011).

Clasificación	Droga o grupo de drogas	Acción sobre sistemas de neurotransmisión	Perfil de efectos clínicos
ANTIPSICÓTICOS TÍPICOS	Haloperidol	Bloqueo D <sub>2</sub> ++++ Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> +/- Bloqueo M +/- Bloqueo α <sub>1</sub> ++ Bloqueo H <sub>1</sub> +/-	Efecto antipsicótico ++++ Efectos extrapiramidales ++++ Efectos atropínicos + Hipotensión ortostática + Sedación +/- Aumento de peso +/-
	Trifluoperazina	Bloqueo D <sub>2</sub> +++ Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> +/- Bloqueo M +/- Bloqueo α <sub>1</sub> + Bloqueo H <sub>1</sub> +/-	Efecto antipsicótico +++ Efectos extrapiramidales +++ Efectos atropínicos + Hipotensión ortostática + Sedación +/- Aumento de peso +/-
	Tioridazina	Bloqueo D <sub>2</sub> ++ Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> + Bloqueo M +++ Bloqueo α <sub>1</sub> ++ Bloqueo H <sub>1</sub> ++	Efecto antipsicótico ++ Efectos extrapiramidales + Efectos atropínicos +++ Hipotensión ortostática ++ Sedación +++ Aumento de peso ++
	Clorpromazina Levomepromazina	Bloqueo D <sub>2</sub> ++ Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> ++ Bloqueo M ++ Bloqueo α <sub>1</sub> + Bloqueo H <sub>1</sub> +++	Efecto antipsicótico + Efectos extrapiramidales + Efectos atropínicos ++ Sedación ++++ Aumento de peso ++
ANTIPSICÓTICOS ATÍPICOS	Risperidona y Paliperidona Ziprasidona	Bloqueo D <sub>2</sub> +++ Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> ++ Bloqueo H <sub>1</sub> + Bloqueo M +	Efecto antipsicótico +++ Efectos extrapiramidales ++ Sedación +/- Efectos atropínicos +/- Aumento de peso +/-
	Quetiapina	Bloqueo D <sub>2</sub> + Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> +++ Bloqueo H <sub>1</sub> ++ Bloqueo M +	Efecto antipsicótico ++ Efectos extrapiramidales + Sedación +++ Aumento de peso ++ Efectos atropínicos +/-
	Olanzapina	Bloqueo D <sub>2</sub> ++ Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> ++ Bloqueo H <sub>1</sub> +++ Bloqueo M +	Efecto antipsicótico ++ Efectos extrapiramidales + Sedación +++ Aumento de peso +++ Efectos atropínicos +/-
	Aripiprazol	Bloqueo D <sub>2</sub> ++ Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> ++ Bloqueo H <sub>1</sub> + Bloqueo M +	Efecto antipsicótico ++ Efectos extrapiramidales + Sedación + Aumento de peso + Efectos atropínicos +/-
	Clozapina	Bloqueo D <sub>2</sub> + Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> +++ Bloqueo H <sub>1</sub> +++ Bloqueo M +++	Efecto antipsicótico ++++ Efectos extrapiramidales + Sedación +++ Aumento de peso +++ Efectos atropínicos +++
	Lurasidona	Bloqueo D <sub>2</sub> + Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> +++ Bloqueo H <sub>1</sub> +/- Bloqueo M +/-	Efecto antipsicótico ++ Efectos extrapiramidales + Sedación +/- Aumento de peso +/- Efectos atropínicos +/-
	Asenapina	Bloqueo D <sub>2</sub> +++ Bloqueo 5HT <sub>2A</sub> +++ Bloqueo H <sub>1</sub> + Bloqueo M +/-	Efecto antipsicótico ++ Efectos extrapiramidales + Sedación +/- Aumento de peso +/- Efectos atropínicos +/-

## Mecanismos de acción de los estabilizantes del estado del ánimo

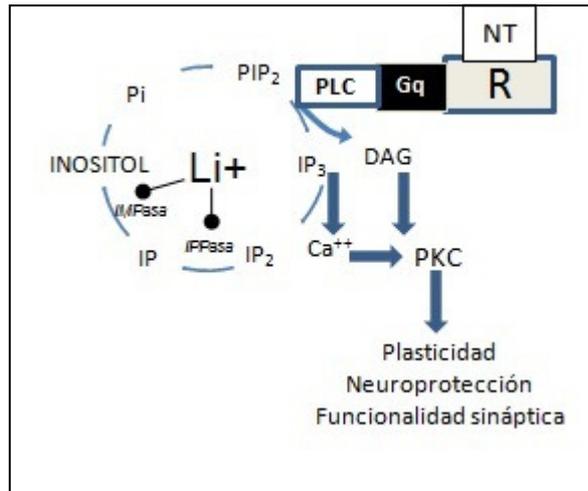
Los estabilizantes del estado del ánimo constituyen un grupo heterogéneo de drogas que tienen en común, desde un punto de vista clínico, su eficacia para prevenir las descompensaciones del estado de ánimo de las personas con trastorno bipolar, atenuar la sintomatología cuando estas descompensaciones se presentan y disminuir la duración de las mismas. Las cuatro drogas de eficacia probada, aunque con distinto perfil de acción son las sales de litio, la carbamazepina, el ácido valproico y la lamotrigina.

Al proponer mecanismos de acción para este grupo de drogas se tropieza con una dificultad, si se quiere epistemológica, que consiste en que no es lo mismo describir acciones a nivel del sistema nervioso o sus células que adjudicar a estas acciones el efecto estabilizante o de corrección de las alteraciones del estado de ánimo. Por ejemplo, si bien hace tiempo que se conoce el efecto del litio sobre el metabolismo de los fosfoinosítidos, no está para nada claro que se pueda adjudicar a este efecto su potencia estabilizante.

Una estrategia que puede colaborar a develar esta incógnita sería buscar las acciones que comparten los fármacos que forman parte del grupo.

En los párrafos que siguen describiremos los mecanismos de acción a los que distintos autores adjudican la acción estabilizante de las cuatro drogas arriba indicadas. Como señalan varios autores, no hay a la fecha información que permita adjudicar a una o varias de estas acciones el efecto estabilizante, por lo que la búsqueda aún continúa. No resulta indiferente para esta difícil tarea la ausencia de modelos experimentales de trastorno bipolar que tengan aceptable validez de constructo, de apariencia y predictiva, cuestión mencionada en la primera parte de este capítulo.

- **Acción sobre el metabolismo de los fosfoinosítidos:** Uno de los mecanismos propuestos para explicar la acción del litio en particular es su interacción con el sitio de afinidad del magnesio en la enzima Inositol Monofosfatasa (IMPasa), y por inhibición de la enzima Inositol Polifosfatasa (IPP) las que participan en el ciclo de los fosfoinosítidos desencadenado por activación de receptores acoplados a proteína Gq. La consecuencia de esta inhibición es el aumento de los niveles de IP3 y consecutivamente a ello la activación de PKC. Los aumentos en la actividad de PKC tiene como consecuencia la plasticidad sináptica, y efectos neuroprotectores. Este mecanismo de acción no fue postulado para los demás estabilizadores del estado de ánimo, siendo al parecer, propio únicamente del litio (Harwood & Agam, 2003).



**Figura 2:** El litio compite con el magnesio por el sitio activo de dos enzimas críticas e el metabolismo de los fosfoinosítidos, la inositol polifosfatasa y la inositol monofosfatasa. El resultado es el aumento de los niveles de IP<sub>3</sub>, el que promueve, en términos mediatos, el aumento de la actividad de PKC. Esta enzima activa cascadas de señalización intranucleares y citoplasmáticas que promueven la plasticidad, la neuroprotección y la funcionalidad sináptica.

**Referencias:** Gq = proteína Gq, IP<sub>3</sub> = inositol trifosfato; ; IMPasa = inositol monofosfatasa; IP<sub>2</sub> = inositol difosfato; IP = inositol monofosfato ; PIP<sub>2</sub> = fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PLC = fosfolipasa C; R = receptor; T = transportador, IPPasa = inositol polifosfatasa

- **Inhibición de la glucógeno sintetasa quinasa 3β (GSK3β):** El litio y el ácido valproico comparten otro mecanismo de acción: la inhibición de la GSK3β (ver Revisión de Jope & Roh, 2006). La inhibición de esta enzima impacta en al menos 40 blancos celulares, pero para el caso que nos ocupa se juzgan relevantes sus acciones de promoción de la plasticidad neuronal a través de su interacción con la proteína asociada a microtúbulos MAP, su promoción de la neurogénesis (Morales-García et al., 2012), y la facilitación de la expresión de genes asociados al trofismo neuronal principalmente a través de la inhibición de la degradación de β-catenina, una proteína que estimula la transcripción génica a nivel del núcleo (ver Revisión de Ferrero, Cereseto, & Sifonios, 2006).
- **Modificación del metabolismo del ácido araquidónico:** La disminución en el turnover de ácido araquidónico, en la actividad de la enzima fosfolipasa A2 y en la síntesis de la prostaglandina E2 en el cerebro es una cascada de eventos comunes como consecuencia del tratamiento crónico con todos los fármacos con acción estabilizante: carbamazepina, litio, ácido valproico y lamotrigina. Esta observación dio lugar a la hipótesis de que este mecanismo media la acción estabilizante, lo que se ve reforzado por la relación entre estas acciones presentes en todos los estabilizantes del estado de ánimo y ausente en otros psicofármacos como el topiramato que

carece asimismo de efecto estabilizante o los antidepresivos que incrementan el turnover de ácido araquidónico y promueven la inestabilidad anímica en personas con trastorno bipolar (Rapoport, Basselin, Kim, & Rao, 2016).

## **Mecanismos de acción de los ansiolíticos e hipnóticos benzodiazepínicos**

El mecanismo de acción de este grupo de drogas es conocido desde hace varias décadas. Consiste en potenciar la acción agonista del GABA en los receptores GABA<sub>A</sub>. A través de esta acción aumenta el efecto inhibitorio del GABA en todas las regiones cerebrales en las que este neurotransmisor regula el nivel de excitación neuronal. La amplísima e inespecífica distribución de estos receptores formula un dilema con repercusiones para la comprensión de la farmacodinamia de las drogas ansiolíticas: ¿el efecto ansiolítico se deriva de un efecto depresor inespecífico o, por el contrario, es mérito de la acción en áreas discretas del sistema nervioso central?

Resultados relativamente recientes nos inclinan por la segunda alternativa. El GABA<sub>A</sub> es un receptor ionotrópico, permeable al anión Cl<sup>-</sup>. Su conformación es pentamérica y las subunidades que lo constituyen son variadas. Para la comprensión de los siguientes párrafos importa señalar que se han descrito 6 subtipos de subunidad  $\alpha$ , de los cuales son relevantes para interpretar las acciones de las benzodiazepinas las  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ .

Cuando mediante procedimientos genéticos se disminuye la presencia de receptores GABA<sub>A</sub> conformados por subunidades  $\alpha 1$  en la amígdala, las benzodiazepinas conservan sus propiedades ansiolíticas pero no las anticonvulsivantes, sedativas y de disminución de la actividad locomotora (Heldt & Ressler, 2010). A partir de estos avances, se obtienen dos conclusiones que apuntan a distintos niveles de acción. A nivel molecular, la conformación de los receptores GABA<sub>A</sub> en términos de la subunidad  $\alpha$  presente condiciona la acción ansiolítica de las benzodiazepinas. A nivel del órgano blanco, el cerebro, un área crítica para esta acción es la amígdala, que forma parte del circuito de respuesta al estrés y la ansiedad.

Estos avances están siendo puestos en valor a través del desarrollo, por el momento en fase experimental, de nuevos compuestos con mayor especificidad de acción, y que por lo tanto discriminen acciones hipnóticas, sedantes, anticonvulsivantes o ansiolíticas (Chen, De Haas, De Kam, & Van Gerven, 2012).

Esta estrategia que apunta a obtener mayor información acerca de elementos que permitan discriminar distintas acciones terapéuticas de las benzodiazepinas también se puede aplicar a la de sus efectos adversos. Por ejemplo la regulación coordinada entre neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA<sub>A</sub> y excitatoria mediada por glutamato puede contribuir a comprender acciones amnesiógenas o relativas a la adquisición de tolerancia con el tratamiento crónico de benzodiazepinas, así como el estudio de los cambios conformacionales del receptor GABA<sub>A</sub> en respuesta al tratamiento prolongado puede aportar para comprender el desarrollo de tolerancia a distintas acciones de estos fármacos (Bonavita y col., 2003; Ferreri y col., 2015; Gutiérrez y col. 2014).

## Últimas palabras: de la farmacodinamia a la prescripción

La toma de decisiones en el curso de un tratamiento médico –y el psiquiátrico no es la excepción, por supuesto- es compleja. Se parece a la confección de un encaje o un traje a medida, y encierra una dosis importante de trabajo artesanal. En el campo de la Psicofarmacología estas características se potencian, dada la naturaleza de la dolencia que presenta el paciente, en la que los aspectos subjetivos constituyen un factor por demás sensible y relevante.

De todos modos, hay algunas reglas generales que podemos sintetizar:

- 1) Al diagnóstico preciso debe seguirle un estudio pormenorizado de los antecedentes personales y familiares del paciente. La buena respuesta a un determinado fármaco predice la respuesta en un nuevo episodio.
- 2) Como los psicofármacos pueden no ser los únicos compuestos que recibe el paciente, una detallada historia clínica fármaco y psicofarmacológica debe ser recogida para analizar y prevenir posibles interacciones adversas. Es de suma importancia saber si el paciente consume además sustancias adictógenas como el alcohol, el tabaco, u otras drogas ilícitas. Su consumo modifica la respuesta al tratamiento en vías de instaurarse.
- 3) En la elección del fármaco debe tenerse en cuenta la evidencia científica disponible, el balance adecuado entre efectos terapéuticos y efectos adversos, y desde luego el posible efecto del fármaco en comorbilidades que pueda presentar el paciente.

En este sentido, entre los distintos antidepresivos disponibles resulta racional elegir los más sedativos si el paciente sufre un episodio depresivo con insomnio o, al contrario, los menos sedativos si el episodio depresivo cursa con hipersomnia. De esta forma muchas veces es factible evitar la prescripción de dos drogas (antidepresivo e hipnótico) para tratar dos dimensiones sintomáticas (depresión y trastorno del sueño) que forman parte del mismo cuadro. Del mismo modo, si un cuadro psicótico se acompaña de excitación, es racional seleccionar un antipsicótico con un perfil sedativo, como podría ser la quetiapina, la olanzapina o la tioridazina.

- 4) La dosis de inicio debe ser baja y la titulación hasta alcanzar la dosis final debe ser lenta, aunque el ritmo muchas veces debe ser modificado para acelerar el tiempo hasta alcanzar la dosis terapéutica, sobre todo cuando el cuadro es severo y corre riesgo la vida del paciente.
- 5) El tratamiento de personas de más de 65 años debe iniciarse con dosis más bajas que las que reciben los adultos jóvenes, ya que su velocidad de metabolización puede estar disminuida. Sin embargo, la dosis final puede no ser menor a la usual en personas más jóvenes.
- 6) Es aconsejable un seguimiento cercano del paciente en las primeras semanas de tratamiento, para atender y manejar los efectos adversos que pudiera presentarse.
- 7) Casi todos los psicofármacos (la excepción son las benzodiazepinas) tienen latencia de varias semanas hasta el inicio de su acción terapéutica. Esto debe serle advertido al paciente y a sus familiares, dado que el motivo más frecuente de falta de respuesta al

tratamiento en Psiquiatría es la interrupción prematura del mismo. Otra causa frecuente de falla terapéutica es el empleo de dosis insuficientes. El profesional tratante debe familiarizarse con las dosis aceptadas para cada fármaco y emplearlas para optimizar la calidad de la respuesta.

- 8) Los tratamientos psicofarmacológicos suelen ser muy prolongados (1 año y generalmente más). La interrupción prematura es la causa más frecuente de recurrencia y discapacidad funcional, por lo que familiarizarse con el curso esperable de un tratamiento en Psiquiatría forma parte de la tarea del médico y debe ser comunicada al paciente.
- 9) La asociación de farmacoterapia y psicoterapia augura una mejor calidad de vida a largo plazo, por lo que siempre que el paciente acuerde, es de buena práctica recomendarle un tratamiento psicoterapéutico o conducir el mismo en la consulta psiquiátrica, siempre que el médico esté familiarizado con este tipo de prácticas.

## Bibliografía

- Belforte, J. E., Zsiros, V., Sklar, E. R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., Nakazawa, K. (2010). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature Neuroscience*, 13(1), 76–83. doi:10.1038/nn.2447
- Beraki, S., Diaz-Heijtz, R., Tai, F., & Ogren, S. O. (2009). Effects of repeated treatment of phencyclidine on cognition and gene expression in C57BL/6 mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 12(2), 243–55. doi:10.1017/S1461145708009152
- Bonavita, C., Ferrero, A., Cereseto, M., Verlárdez, M., Rubio, M., & Wikinski, S. (2003). Adaptive changes in the rat hippocampal glutamatergic neurotransmission are observed during long-term treatment with lorazepam. *Psychopharmacology (Berl)*, 166(2), 163.167. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00213-002-1373-y>
- Campos, A. C., Fogaca, M. V., Aguiar, D. C., & Guimaraes, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35, S101–S111. doi:10.1590/1516-4446-2013-1139
- Cantrup, R., Sathanantham, K., Rushlow, W. J., & Rajakumar, N. (2012). Chronic hyperdopaminergic activity of schizophrenia is associated with increased  $\Delta$ FosB levels and cdk-5 signaling in the nucleus accumbens. *Neuroscience*, 222, 124–35. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.07.027
- Chen, X., De Haas, S., De Kam, M., & Van Gerven, J. (2012). An overview of the CNS-pharmacodynamic profiles of nonselective and selective GABA agonists. *Advances in Pharmacological Sciences*. doi:10.1155/2012/134523
- Delay, J., & Deniker, P. (1952). Le traitements de psychoses par une méthode neurolytique dérivée de l'hibernothérapie; le 4560 RP utilisée seul en cure prolongée et continue. CR

- Congr Méd Alién Neurol (France), 50:497–50. In *CR Congr Méd Alién Neurol* (pp. 497–450). France.
- Duman, R. S. (2009). Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: stress and depression. *Dialogues Clin Neurosci*, 11, 239–255.
- Ferreri, M. C., Gutiérrez, M. L., & Gravielle, M. C. (2015). Tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam is associated with different alterations of GABAA receptors in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 310, 152–62. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.09.038
- Ferrero, A., Cereseto, M., & Sifonios, L. (2006). La relación entre la señalización mediada por Wnt y las enfermedades psiquiátricas. *Vertex (Buenos Aires, Argentina)*, 17(67), 165–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847474>
- Gilmour, G., Arguello, A., Bari, A., Brown, V. J., Carter, C., Floresco, S. B., ... Robbins, T. W. (2012). Measuring the construct of executive control in schizophrenia: Defining and validating translational animal paradigms for discovery research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.04.006
- Gutiérrez, M. L., Ferreri, M. C., & Gravielle, M. C. (2014). GABA-induced uncoupling of GABA/benzodiazepine site interactions is mediated by increased GABAA receptor internalization and associated with a change in subunit composition. *Neuroscience*, 257, 119–29. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.10.077
- Hagan, J. J., & Jones, D. N. C. (2005). Predicting drug efficacy for cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 31(4), 830–53. doi:10.1093/schbul/sbi058
- Harwood, A. J., & Agam, G. (2003). Search for a common mechanism of mood stabilizers. *Biochem Pharmacol*, 66, 179–189. doi:10.1016/S0006-2952(03)00187-4
- Heldt, S. A., & Ressler, K. J. (2010). Amygdala-Specific Reduction of 1-GABAA Receptors Disrupts the Anticonvulsant, Locomotor, and Sedative, But Not Anxiolytic, Effects of Benzodiazepines in Mice. *Journal of Neuroscience*, 30(21), 7139–7151. doi:10.1523/JNEUROSCI.0693-10.2010
- Howes, O. D., & Kapur, S. (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 549–62. doi:10.1093/schbul/sbp006
- Jope, R., & Roh, M.-S. (2006). Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Psychiatric Diseases and Therapeutic Interventions. *Curr Drug Targets*, 7(11), 1421–1434. doi:10.1038/nature13314.A
- Jufe, G. (2006). *Psicofarmacología práctica* (2da ed.). Buenos Aires: Polemos.
- Kos, T., Nikiforuk, A., Rafa, D., & Popik, P. (2011). The effects of NMDA receptor antagonists on attentional set-shifting task performance in mice. *Psychopharmacology*, 214(4), 911–21. doi:10.1007/s00213-010-2102-6
- Mauri, M. C., Paletta, S., Maffini, M., Colasanti, A., Dragogna, F., Pace, C. Di, ... Policlinico, O. M. (2014). Clinical Pharmacology of Atypical antipsychotics: an update. *EXCLI*, 13, 1163–1191.

- Meyer, J. (2011). Tratamiento de la psicosis y la manía. In L. Brunton, B. Chabner, & B. Knollman (Eds.), *Goodman & Gillman. Las bases farmacológicas de la terapéutica* (12<sup>a</sup> ed., pp. 417–456). México: McGraw- Hill Medical.
- Miyamoto, S., Duncan, G. E., Marx, C. E., & Lieberman, J. a. (2005). Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Molecular Psychiatry*, *10*(1), 79–104. doi:10.1038/sj.mp.4001556
- Morales-Garcia, J. A., Luna-Medina, R., Alonso-Gil, S., Sanz-Sancristobal, M., Palomo, V., Gil, C., ... Perez-Castillo, A. (2012). Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo. *ACS Chemical Neuroscience*, *3*(11), 963–71. doi:10.1021/cn300110c
- Nakazawaa, K., Zsirosa, V., Jianga, Z., Nakaoa, K., Kolataa, S., Zhanga, S., & Belforte, J. (2013). GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*, *18*(9), 1199–1216. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate
- Poels, E. M. P., Kegeles, L. S., Kantrowitz, J. T., Slifstein, M., Javitt, D. C., Lieberman, J. A., ... Girgis, R. R. (2014). Imaging glutamate in schizophrenia: review of findings and implications for drug discovery. *Molecular Psychiatry*, *19*(1), 20–9. doi:10.1038/mp.2013.136
- Rapoport, S., Basselin, M., Kim, H.-W., & Rao, J. (2016). Bipolar disorder and mechanisms of action of mood stabilizers. *Brain Res Rev*, *61*(2), 185–209. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.06.003
- Watkins, C. C., & Andrews, S. R. (2015). Clinical studies of neuroinflammatory mechanisms in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. doi:10.1016/j.schres.2015.07.018
- Wikinski, S. (2008). Psicofármacos y teorías etiopatogénicas en Psiquiatría. Del contexto de descubrimiento al obstáculo epistemológico. *Vertex*, *19*(80), 196–200. Retrieved from <http://www.polemos.com.ar/vertex80.php>
- Wikinski, S. (2011). Fisiopatogenia en Psiquiatría: ¿descubrimiento, construcción o descubrimiento + construcción? El “caso” de la depresión. *Vertex*, *22*(100), 444–453. Retrieved from <http://www.polemos.com.ar/vertex100.php>

# CAPÍTULO 8

## Evaluación de la seguridad de productos farmacéuticos y biofarmacéuticos

*Pablo Quiroga*

### Introducción

Este capítulo está orientado a desarrollar los principios básicos de la toxicología, las etapas del proceso tóxico y de manera sintética, como aplicar los mismos a la interpretación de los datos obtenidos durante los estudios no clínicos de seguridad, permitiendo de esta manera realizar la evaluación del perfil toxicológico / evaluación de seguridad de los nuevos agentes terapéuticos, ya sean estos pequeñas o grandes moléculas (biofarmacéuticos), y a partir de ellos permitir la realización de los estudios de primera administración en humanos minimizando el riesgo del mismo.

### Conceptos y definición de toxicología y toxicidad.

#### Etapas del proceso tóxico

Para desarrollar, comprender e interpretar los estudios no clínicos de seguridad aplicados durante el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos de uso humano, debemos revisar los conceptos de la toxicología. La toxicología es la ciencia que estudia los venenos y etimológicamente procede del griego antiguo *toxicon*, si bien podemos encontrar diferentes definiciones de **toxicología**, en este capítulo definiremos la misma como: *la ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad.*

Uno de los conceptos fundamentales de la toxicología se basa en que la dosis hace el veneno, no hay una diferencia esencial entre el tóxico y el medicamento, solo la diferencia de dosis establece uno u otro resultado final. Teniendo en cuenta este concepto, podríamos entender erróneamente al fenómeno tóxico como un evento dependiente de la dosis de una forma

totalmente determinista o exclusiva, sin embargo, el desarrollo de la toxicología, ha permitido poner de manifiesto en qué medida son importantes, las variaciones de sensibilidad a los tóxicos dependientes de la idiosincrasia personal dentro de la población humana, de esta manera podemos observar que en toda población habrá un segmento de individuos más sensibles y otro más resistente ante un mismo grado de exposición

**La toxicidad** es definida generalmente como *la capacidad intrínseca de un determinado agente/sustancia de generar un “daño” en un organismo vivo*, teniendo en cuenta esta definición debemos preguntarnos que entendemos o interpretamos por la palabra “daño”, en el contexto de este capítulo podríamos definirla como los efectos adversos sobre la salud, asociados con un cambio, reducción, o pérdida de las funciones vitales. Claramente los agentes terapéuticos pueden inducir o estar relacionados con un espectro amplio de efectos indeseables sobre la salud. En este punto debemos resaltar que cuando se evalúa la seguridad de los nuevos agentes terapéuticos, la misma está enfocada en estudiar y determinar los efectos adversos directos e indirectos asociados con los niveles de dosis o exposición (Área Bajo la Curva o Concentración plasmática) dentro del rango terapéutico.

De lo expuesto anteriormente, podemos observar, porque la toxicología es un componente esencial en el proceso de desarrollo de un nuevo agente terapéutico, ya que a partir de la misma podremos establecer un balance entre la seguridad y eficacia de un medicamento.

En párrafos anteriores hemos descrito que solo la dosis hace al veneno, no hay una diferencia esencial entre el tóxico y el medicamento, solo la diferencia de dosis establece uno u otro resultado final, en virtud de este concepto nos referiremos a continuación a la relación dosis- respuesta que ya han visto en capítulos anteriores.

## **Relación Dosis-efecto y Dosis-respuesta**

La exposición tóxica y el espectro de efectos producidos, siguen una relación correlativa denominada relación dosis – respuesta, la cual constituye el concepto fundamental de la toxicología. Como en farmacología, en toxicología, existe una relación cuantitativa entre la “dosis” (magnitud de la exposición) y la “respuesta tóxica” (magnitud del efecto adverso inducido), desde un punto de vista práctico, puede responder a una correlación entre la dosis / nivel de exposición y la magnitud de un efecto que tenga una intensidad gradual en un individuo (*relación dosis- efecto, ej. extensión de la toxicidad a nivel hepático, expresada en función de la actividad de las transaminasas en la sangre o el nivel de bilirrubina*), o bien a la relación que puede establecerse entre la distribución de las respuestas a diferentes niveles de dosis / niveles de exposición dentro de una población de individuos (*relación dosis – respuesta*), en este caso la respuesta es cuantal o de “todo o nada”. Sea cual fuere la respuesta o punto final específico seleccionado para la medición, la relación entre el grado de respuesta del sistema biológico y la dosis de la sustancia tóxica administrada adopta una forma constante. La forma de la curva *dosis – respuesta*, define importantes características del agente tóxico y su modo o

mecanismo de acción, la pendiente de la curva a dosis altas puede ser muy diferente de la forma de esa misma curva a dosis baja (ej: toxicidad del paracetamol) y por otra parte, la forma de la curva revela la magnitud de las variaciones de sensibilidad entre individuos de una población ante un mismo nivel de dosis / exposición a un tóxico.

## Etapas del Proceso Tóxico

En las ciencias biológicas, el entendimiento de los procesos biológicos complejos, ha sido el resultado de la separación o disección del sistema en sus diferentes partes componentes. Actualmente es aceptado que la mayoría de los controles de los procesos complejos, están mediados por la afinidad y / o reacción covalente de sustancias específicas con regiones particulares en las macromoléculas (receptores). Teóricamente, la intensidad de un efecto tóxico, depende de la concentración y la persistencia del producto tóxico final en su lugar de acción.

La iniciación de una intoxicación, se inicia por la interacción entre estructuras macromoleculares particulares o específicas, las cuales en algunos casos, pero no siempre pueden ser los receptores farmacológicos. Es importante destacar que los efectos tóxicos se producen cuando las alteraciones desencadenadas por las sustancias superan la capacidad de reparación, o cuando esta reparación es anómala. En el desarrollo de la toxicidad podemos describir 5 etapas (Figura 1), las cuales se describen a continuación:

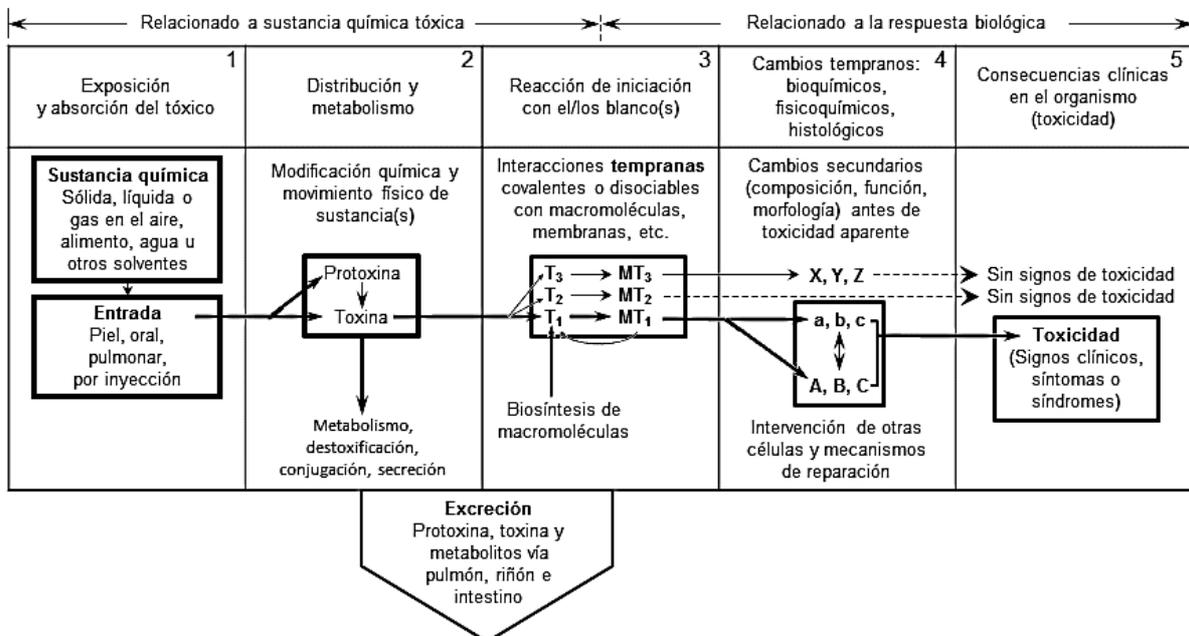


Figura 1: etapas del proceso tóxico (Esquema de Aldridge)

### **Etapa 1-Exposición y absorción del tóxico**

La absorción, es la transferencia de una sustancia química desde el lugar de exposición (una superficie corporal externa o interna) hacia la circulación general, la absorción depende de las características fisicoquímicas de la sustancia. Las vías de exposición pueden ser a través de la piel, el tubo digestivo, vías respiratorias, lugar de inyección, placenta, etc.).

### **Etapa 2 -Distribución y metabolismo**

Esta etapa incluye el movimiento físico del agente y la modificación química del mismo (metabolismo), las sustancias pueden sufrir procesos de bioactivación o activación metabólica o bioinactivación o detoxificación. Durante el proceso de bioactivación, se le confiere a la sustancia propiedades fisicoquímicas, las cuales las transforman en compuestos que pueden desarrollar toxicidad, en cambio durante la bioinactivación, el agente o tóxico es convertido a un compuesto menos tóxico o no tóxico, en algunos casos, los procesos de bioactivación y bioinactivación compiten entre si. Durante esta fase del proceso tóxico, las sustancias tóxicas pasan de la sangre al espacio extracelular y alcanzan su lugar de acción.

### **Etapa 3- Reacciones de iniciación con el o los blancos**

Un blanco es una célula, una organela sub-celular o un componente de la célula, el cual, cuando es modificado por una sustancia química, a menudo conduce a un cambio o cambios biológicos, los cuales causan una disfunción y toxicidad. Prácticamente todos los compuestos endógenos son objetivos potenciales de las sustancias tóxicas, los blancos moleculares más frecuentes y de mayor trascendencia toxicológica son los ácidos nucleicos (en especial el ADN), las proteínas y las membranas. La reacción del tóxico con el o los blancos biológicos respectivos, inicia el proceso que conduce a la toxicidad, esta parte del proceso tóxico, constituye el centro del mismo y define los eventos primarios, los cuales son seguidos posteriormente por cambios biológicos tempranos en la etapa 4 y los signos o síntomas de toxicidad. Es importante destacar en este punto que no todas las reacciones del tóxico con sus blancos van a conducir a los efectos tóxicos, esto es debido a que el tóxico puede reaccionar con una molécula, pero los cambios biológicos que induce en la misma no provocan consecuencias adversas o la reacción entre el tóxico y el blanco, no provoca cambios biológicos en el mismo (en este caso se considera que esta estructura, es un blanco en el sentido de que reacciona con el tóxico), por lo cual, estas reacciones constituyen un proceso de bioinactivación del tóxico, ya que de esta manera, permiten que otros blancos moleculares que si tienen importancia toxicológica no sean alcanzados. Los atributos que debe poseer una molécula blanco para el desarrollo de un efecto tóxico son: apropiada reactividad y configuración estérica que permita que el tóxico último pueda reaccionar con la misma de forma covalente o no covalente, debe ser accesible al tóxico y debe cumplir una función crítica.

#### **Etapas 4- Cambios tempranos subclínicos**

Como se indicó en la etapa anterior, la interacción del tóxico con el blanco puede provocar un deterioro en una función celular o disfunción celular, la disfunción celular primaria que se origine, dependerá de las funciones de la molécula blanco afectada, si la molécula está implicada en el proceso de regulación celular, primero ocurrirá una mala regulación de la expresión genética, y una mala regulación de la función celular momentánea, pero si la molécula afectada, está involucrada con la conservación celular, la reacción resultante puede poner en peligro la supervivencia celular; frente a estas alteraciones, el organismo intentará reparar las mismas, la reparación molecular y celular forma parte de los mecanismos fisiológicos de defensa frente a lesiones espontáneas y lesiones inducidas por agentes exógenos. Cuando se desarrolla la toxicidad, la misma es el resultado o consecuencia de una reparación anómala o inapropiada, ya sea porque el daño que se ha producido es tan severo y el sistema de reparación del mismo está dañado o es insuficiente. Resumiendo si la alteración de la función o disfunción es severa y no es reparada, originará numerosas consecuencias biológicas las cuales se manifestarán en síntomas de toxicidad, ingresando así en la etapa 5 o final del proceso tóxico. Estas consecuencias pueden ser inmediatas, de corta duración, tomar un tiempo determinado para desarrollarse, puede durar un corto tiempo, un largo tiempo o ser permanente. Si la disfunción resultante no es severa o es reparada adecuadamente, la interacción del tóxico con el blanco no tendrá consecuencias adversas para la salud.

#### **Etapas 5- Toxicidad**

Esta fase es caracterizada por los signos o síntomas clínicos o síndromes.

### **Estudios no clínicos de seguridad para pequeñas moléculas terapéuticas**

El principio fundamental de los estudios no clínicos (preclínicos) de seguridad, es caracterizar el rango completo de posibles acciones de un agente terapéutico en desarrollo, es decir, determinar la dosis o niveles de exposición en la que los efectos (presumiblemente predictivos de eventos adversos en humanos) ocurren por primera vez y la a dosis o exposición, en la que no se producen tales efectos (ej: Nivel Sin Efecto Adverso Observado- NOAEL). Los objetivos de estos estudios de acuerdo a los lineamientos de "Non-Clinical Safety Studies For The Conduct Of Human Clinical Trials For Pharmaceuticals (ICH) M3 (R2 2009), se detallan a continuación:

- ✓ Permitir el inicio de ensayos clínicos y soportar subsecuentes investigaciones clínicas.
- ✓ Recomendar la dosis inicial segura, esquema de escalado de dosis, régimen de dosificación, ruta de administración, para los ensayos clínicos.
- ✓ Caracterizar los efectos tóxicos con respecto a los potenciales órganos blancos de toxicidad, dependencia con la dosis / exposición.

- ✓ Identificar los parámetros a ser monitoreados durante el ensayo clínico (biomarcadores de seguridad y actividad / eficacia).
- ✓ Discernir entre los mecanismos de actividad / toxicidad, reversibilidad de los efectos y efectos retardados.
- ✓ Identificar las poblaciones humanas de riesgo (criterios de exclusión /inclusión).

Los objetivos descriptos anteriormente, nos permitirán obtener el perfil toxicológico del agente terapéutico bajo estudio, la utilidad de este perfil, se basa en el principio de que, los estudios no clínicos de duración y dosis suficientes avalan el uso seguro de un fármaco en desarrollo en los ensayos clínicos y eventualmente, en el mercado.

Los estudios de toxicología generalmente se diseñan con el objetivo de maximizar el potencial de identificación de efectos adversos ya sean "sobre el blanco" (asociados a la farmacología prevista) o "fuera del blanco" (distintos del objetivo biológico previsto).

El estudio de Seguridad No-Clínico incluye:

- ✓ Estudio de Toxicidad a una sola dosis (Toxicidad aguda)
- ✓ Estudio de Toxicidad a dosis repetidas
- ✓ Estudios de Toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo
- ✓ Estudios de genotoxicidad
- ✓ Estudios de Tolerancia Local
- ✓ Evaluación del potencial Carcinogénico (drogas para patologías especiales o administración por largo período de tiempo)
- ✓ Seguridad farmacológica (evaluación sobre los sistemas: Cardiovascular, SNC y Respiratorio)
- ✓ Inmunotoxicidad, Fototoxicidad, toxicidad en animales jóvenes \*si el mismo es requerido")

## Métodos Alternativos

Previamente a la descripción de los diferentes estudios enumerados anteriormente, nos referiremos al principio de las 3 R's (principio descrito en la guía ICH M3 (R2)) y los métodos alternativos. El término "alternativo" está generalmente asociado al Principio de las 3R's (European Centre for the Validation of Alternative Methods), este principio, está orientado a: **R**educir el número de animales necesarios en el estudio, permitiendo igualmente obtener resultados confiables, **R**efinar los procedimientos / protocolos de toxicología, para que los mismos sean menos dolorosos o estresantes para los animales de laboratorio y **R**eemplazar los animales de laboratorio con estudios *in-vitro*, *ex-vivo* o *in-silico models*.

Las "3 Rs", proveen una estrategia racional para minimizar la utilización y el estrés o sufrimiento de los animales de laboratorio, sin comprometer la calidad de Los datos obtenidos en el estudio. Los métodos alternativos que se desarrollan para reducir o reemplazar los estudios en animales están basados en sistemas *in vitro* o modelos computacionales. En la práctica, estos

métodos se utilizan actualmente para soportar la planificación e interpretación de los estudios de toxicidad en animales de laboratorio y no se utilizan, como sustitutos de los estudios de toxicidad con animales laboratorio.

### **Toxicidad a una sola dosis- Toxicidad aguda (Single Dose Toxicity)**

La toxicidad aguda, se refiere a los efectos adversos que ocurren posteriores a la administración de una sola dosis o múltiples dosis de la sustancia en estudio en un período de 24 hs., cuando la vía de administración es la vía oral, la guía ICH M3, recomienda actualmente que la toxicidad aguda o de una sola dosis, debe llevarse a cabo, antes de los estudios clínicos de primera administración en humanos y ser evaluada utilizando: la vía de administración propuesta clínicamente y si es factible la vía intravenosa, realizarse en dos especies mamíferas: roedores y no roedores, de ambos sexos,

La utilidad de estos estudios específicos con el objetivo de soportar estudios clínicos, ha sido cuestionada en los últimos tiempos, Robinson and Cols, han demostrado que los datos obtenidos durante estos estudios, nunca han sido utilizados para soportar la planificación y la conducción de los estudios clínicos tempranos. Los autores encontraron que los datos de los estudios de toxicidad aguda, nunca fueron utilizados en la selección de las dosis para los estudios clínicos de primera administración, ni tampoco para la determinación de los parámetros a monitorear o identificación de los órganos blancos de toxicidad. Por otra parte, la utilización de una segunda especie o una segunda ruta o vía de administración en estos estudios, no aporta información adicional. En virtud de esta revisión y la experiencia obtenida durante la evaluación de los datos utilizados para soportar la autorización de un producto farmacéutico, la Agencia Europea de Medicamentos en su Concept Paper On Single Dose / Acute Toxicity (2008), ha concluido que los datos obtenidos en los estudios específicos de toxicidad aguda, tienen un valor muy limitado para la evaluación de la seguridad de los productos medicinales de uso humano. Por otra parte dicho documento, describe que los puntos finales evaluados durante estos estudios, pueden ser evaluados generalmente durante los estudios de toxicidad a dosis repetidas, si estos son adecuadamente diseñados, estos estudios incluyen entre otros niveles de dosis, la administración de la dosis máxima tolerada (detallada en el punto siguiente). En aquellos casos, en los cuales existe el riesgo de sobredosificación, los estudios de toxicidad aguda en una sola especie y utilizando una sola vía de administración relevante pueden ser de utilidad, siempre y cuando no pueda ser obtenida dicha información a partir de los datos obtenidos durante los estudios toxicidad a dosis repetidas o de seguridad farmacológica. Actualmente las guías de OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), descritas para el estudio de la Toxicidad aguda oral son: OECD 420- Procedimiento de Dosis Fija; OECD 423- Método de la Clase Tóxica Aguda y OECD 425- Procedimiento del Up and Down. Estos lineamientos constituyen una alternativa a la guía de toxicidad aguda convencional (OECD 401 – DL<sub>50</sub>), la cual fue eliminada en virtud de los principios de las 3 R's antes mencionados.

Existen métodos alternativos desarrollados con el objetivo de reemplazar la utilización de animales de laboratorio para la determinación de la dosis de inicio en los estudios de toxicidad oral aguda, pero igualmente, los estudios *in vivo* son requeridos con el objetivo de obtener una evaluación completa de la toxicidad, entre ellos podemos destacar el *In vitro* cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests (OECD GD 129).

## **Toxicidad a dosis repetidas**

La toxicidad a dosis repetidas, permite caracterizar la toxicidad acumulativa de un agente terapéutico bajo estudio. Cuando nos referimos a toxicidad acumulativa, nos referimos a la misma desde dos aspectos, uno cualitativo (objetivo: evaluar cuales son los órganos blancos de toxicidad) y uno cuantitativo (objetivo: definir a que niveles de dosis, o más importante, a que niveles de exposición plasmáticos o tisular, los efectos adversos son observados o no son observados - NOAEL). La duración de estos estudios, está relacionada o depende de la duración del estudio clínico, la indicación terapéutica y el objetivo del ensayo clínico propuesto.

Los estudios de toxicidad a dosis repetidas, se deben realizar en dos especies mamíferas, una roedora y una no roedora, de ambos sexos, un grupo control, un grupo control positivo (cuando es apropiado) y al menos tres niveles de dosis, un *nivel de dosis baja*, el cual deberá ser capaz de producir un efecto farmacodinámico; un *nivel de dosis alta* (más adelante describiremos como seleccionamos la misma), el cual deberá permitir identificar el / los potenciales órganos blancos de toxicidad u otros signos de toxicidad no específicos, y un *nivel de dosis medio*, el cual corresponde generalmente a la media geométrica entre los niveles de dosis baja y dosis alta. Es de fundamental importancia que durante el desarrollo de estos estudios, se obtengan datos farmacocinéticos (concentración plasmática y/o tisular; área bajo la curva), ya que es universalmente reconocido que tanto la eficacia como la seguridad de un fármaco, correlaciona mejor con la exposición sistémica que directamente con los niveles de dosis utilizados. Cuando los datos de exposición se obtienen durante los estudios de toxicidad, el estudio recibe el nombre de toxicocinética.

Al inicio del desarrollo de este punto, nos referimos al término NOAEL, la determinación del mismo es uno de los objetivos de este tipo de estudio y es de vital importancia para la estimación de la máxima dosis de inicio recomendada en los estudios de primera administración en voluntarios adultos sanos. NOAEL lo podemos definir como: el mayor nivel de dosis o exposición que no produce un significativo incremento de efectos adversos biológicamente significativos en comparación al grupo control.

En este punto debemos preguntarnos, como se selecciona el nivel de dosis alto para los estudios de toxicidad general para responder esta pregunta, nos basaremos en la guía ICH (M3) (R2) en la cual se describen diferentes criterios para seleccionar la misma. Estos criterios tienen el objetivo de prevenir la utilización de niveles de dosis en animales, los cuales no adicionan valor para la predicción de la seguridad clínica durante el desarrollo de un nuevo agente

terapéutico. Es importante destacar que en ausencia de toxicidad a dosis altas, si se alcanza un múltiplo adecuado de la exposición entre la dosis máxima evaluada en los estudios de toxicidad a dosis repetida y el nivel de exposición que se espera en los ensayos clínicos (por ejemplo, estudios de primera administración - FIH), los estudios en humanos pueden proceder de forma segura. Lo fundamental poder estimar una dosis de inicio segura para estudios en humanos, los mismos deben ser adecuados para caracterizar los efectos adversos potenciales que pueden ocurrir bajo las condiciones del ensayo clínico que soportan.

#### **Criterios para la selección del nivel de dosis alto en los estudios de toxicidad**

- Basado en la Dosis Máxima Tolerada: nivel de dosis capaz de originar un mínimo efecto tóxico o sobre el organismo (pérdida de peso no mayor al 10 %), o sobre el órgano blanco o alteraciones significativas en los parámetros clínicos patológicos
- Basado en la Dosis Límite: la dosis de 1000 mg / kg día para roedores y no roedores, es apropiada en todos los casos excepto si: 1000 mg / Kg día es < (menor) a 10 veces el Margen de exposición medio en referencia a la exposición clínica esperada y la Dosis Clínica es > (mayor) a 1 g / día, en este caso la dosis para los estudios de toxicidad es limitada por: 10 veces el margen de exposición respecto de la exposición clínica esperada, 2000 mg / Kg día, la Máxima Dosis Práctica o Posible (MFD), y de las dosis propuestas anteriormente, se deberá seleccionar la menor. En aquellas raras situaciones donde: 2000 mg / Kg día es menor que la exposición clínica esperada, una dosis mayor y hasta el valor de la MFD puede ser considerada como la dosis mayor a utilizar.
- Dosis alta basada en la saturación de la exposición: Cuando los datos toxicocinéticos demuestran una exposición límite en la absorción tanto de la droga y / o sus metabolitos, la menor dosis que conduce a la máxima exposición, debe ser utilizada como dosis límite, en ausencia de otras dosis límites. Se puede demostrar la saturación de la exposición cuando un Incremento de dos veces la dosis genera un incremento < (menor) al 20 % en el Área Bajo la Curva, este criterio aplicado para demostrar la saturación, no es un criterio regulatorio.
- Dosis Máxima Práctica o Posible: en este caso, la dosis está limitada por la máxima concentración de la droga a ser formulada y el volumen de dosis que puede ser administrado durante la duración del estudio. La formulación óptima, será aquella que permita obtener el mayor nivel de exposición a la dosis requerida, para definir la misma debemos tener en cuenta las Buenas prácticas de administración en la cual, el máximo volumen de dosis a ser administrado en ratas es de hasta 10 mL/ kg por administración, la solubilidad del principio activo, la máxima concentración factible de ser formulada y la tolerancia local. Otros criterios son los niveles de dosis que representan 50 veces el margen de exposición clínica esperada y el criterio de valor farmacodinámico.

## Evaluación del potencial genotóxico de los productos farmacéuticos de uso humano

Para la evaluación del riesgo genotóxico aplicaremos los conceptos de la toxicología genética o genética toxicológica, la función de la misma es identificar y analizar la acción de aquellos agentes que interaccionan con los ácidos nucleicos para alterar el material hereditario de los organismos vivos. El objetivo principal de los estudios de genotoxicidad realizado sobre los diferentes agentes terapéuticos en desarrollo, es el análisis de su posible acción como mutágenos, mediante pruebas biológicas (las mismas se determinan o seleccionan en función del tipo de daño genético que se quiere detectar, la capacidad metabólica del sistema de prueba en relación con la estructura química del compuesto a analizar, el uso propuesto del agente químico y el valor predictivo del ensayo en términos de mutagenicidad y carcinogenicidad) que permitan poner en evidencia ese modo de actuar no deseado. Por medio de estos ensayos, se puede corroborar si una alteración particular en el ADN se traduce en una mutación. Los estudios de las modificaciones producidas directamente en esa molécula (ADN), nos permitirán estimar a corto plazo, que puede ocurrir cuando un compuesto dado tiene acceso a la misma, ya sea mediante estudios *in vivo* o *in vitro*, elucidando así los mecanismos más probables implicados en el proceso mutagénico. Es importante destacar, que ningún ensayo por si solo es capaz de suministrar los datos necesarios para establecer el probable riesgo mutagénico y posible riesgo carcinogénico de un agente terapéutico en desarrollo, por esta razón es importante analizar diferentes niveles de evaluación, en los cuales, cada uno de ellos permite evaluar diferentes niveles de daño al material genético:

*Nivel Primario:* Bacteriano o molecular- detecta mutaciones puntuales – Ensayos en procariontas. Test de Ames.

*Nivel Secundario:* nivel celular, utiliza cultivos de células y permite caracterizar el daño genético en líneas celulares establecidas. Ej CHO, linfoma de ratón 5178Y

*Nivel Terciario:* nivel orgánico, se aplica en plantas y animales, se analizan los cambios en un individuo como un todo.

*Nivel Cuaternario:* epidemiológico

La Guidance On Genotoxicity Testing and Data Interpretation For Pharmaceutical Intended For Human Use ICH – S2 (R1)- Noviembre 2011, optimiza la batería de las pruebas estándar de toxicología genética que son necesarias regulatoriamente para predecir el riesgo potencial en humanos y provee una guía o lineamientos para la interpretación de los resultados obtenidos, con el objetivo final de mejorar la caracterización del riesgo para efectos carcinogénicos que tengan su base u origen en cambios en el material genético, los diferentes ensayos que se deben realizar para evaluar el potencial genotóxico, se basan en ensayos que cubren los tres primeros niveles de evaluación descritos anteriormente, esta guía propone dos opciones de evaluación, en cada una de ellas deberán realizarse los diferentes niveles indicados:

### **Opción 1**

- *Evaluación de la mutagenicidad:* para la misma se propone la realización del test de mutación reversa en bacterias (OECD - 471)- Test de Ames- este ensayo ha demostrado que detecta cambios genéticos relevantes en la mayoría de los agentes que han demostrado ser genotóxicos en roedores y carcinógenos en humanos. Este estudio corresponde al *Nivel Primario de Evaluación*.
- *Evaluación de la genotoxicidad:* para la misma se propone los estudios en células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*. Test *in vitro*: Test de Aberración Cromosómica en metafase, Test de Micronúcleos *in vitro* (OECD 487) o Test de Mutación Génica en células de mamíferos utilizando la Línea celular 5178Y en células de linfoma de ratón MLA- (OECD – 476). Estos estudios corresponden al *Nivel secundario de evaluación*.
- Test *in vivo*: los mismos son incorporados debido a que algunos agentes son mutagénicos *in vivo* pero no *in vitro* – Ej. Hidroquinona. Estos estudios toman en cuenta la absorción, distribución, metabolismo y excreción a diferencia de los estudios *in vitro*. La guía propone el Test de Micronúcleos en eritrocitos de Mamíferos *in vivo* (OECD - 474), este ensayo es el más ampliamente utilizado y permite evaluar el daño citogenético, otro ensayo puede ser el de Aberraciones Cromosómicas en células en Metafase. Estos estudios corresponden al *Nivel terciario de evaluación*

### **La opción 2 propone**

- *Evaluación de la mutagenicidad:* para la misma se propone la realización del test de mutación reversa en bacterias (OECD - 471)- Test de Ames
- *Test in vivo:* Test *in vivo* para evaluar el daño cromosomal, utilizando células hematopoyéticas de roedores: ej. Test de Micronúcleos en Eritrocitos de Mamíferos (OECD - 474) y el Ensayo de la rotura de la cadena del ADN en hígado.

Mediante la aplicación de estos diferentes ensayos podemos definir el mecanismo por el cual un agente terapéutico en desarrollo puede alterar el material genético.

Existen métodos *in silico* o computacionales que permiten predecir el potencial genotóxico de una molécula bajo estudio, entre ellos podemos citar: Toxtree, CAESAR, Lazar, Derex, MultiCASE, OECD Toolbox, los mismos se basan en la presencia de alertas estructurales y Q (SAR)

## **Valoración de la Toxicidad sobre la Reproducción y el Desarrollo Embrionario en Productos Farmacéuticos de Uso Humano**

La reproducción y el desarrollo comprenden una compleja sucesión de procesos fisiológicos relacionados, que van desde la producción de los gametos, la fertilización, la implantación, la organogénesis, el desarrollo fetal, el desarrollo postnatal y la maduración sexual.

El objetivo de estos estudios, es detectar *cualquier* efecto potencial del agente terapéutico y / o sus metabolitos, sobre el proceso reproductivo de los mamíferos adultos o sobre el crecimiento, desarrollo y capacidad reproductiva de su descendencia, caracterizándolos mediante la determinación del NOAEL. Durante el mismo debemos evaluar el desarrollo y maduración de los gametos, la cópula, la implantación y el desarrollo embrionario y fetal, hasta el parto, el destete, el crecimiento, la adaptación a la vida independiente y la madurez sexual de la generación filial. La toxicidad sobre el desarrollo evalúa todo efecto adverso inducido previo al alcance de la vida adulta. Incluye efectos inducidos o manifestados en el periodo embrionario o fetal y aquellos inducidos o manifestados de manera postnatal.

La guía ICH: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility. S5 (R2), establece, las bases para diseñar una estrategia para el estudio de la toxicología de la reproducción, especialmente encaminada al registro de medicamentos, los ensayos recomendados están dirigidos a la detección del efecto tóxico y la caracterización del mismo.

Esta guía propone tres tipos de estudios: la evaluación de la fertilidad y desarrollo embrionario temprano, el cual, permite evaluar la acción del agente terapéutico en estudio sobre la fertilidad, la copulación, y la implantación (se recomienda la utilización de al menos una sola especie mamífera, preferiblemente la rata); la evaluación sobre desarrollo pre- y postnatal, incluyendo la función maternal, el cual permite evaluar, las consecuencias de las exposiciones postnatales al agente terapéutico y/o sus metabolitos posteriores a la organogénesis (se recomienda la utilización de al menos una sola especie mamífera, preferiblemente la rata) y por último la evaluación sobre desarrollo embrio-fetal (**teratogenia**), el mismo evalúa la exposición al agente y / o sus metabolitos desde la implantación y la organogénesis (período embrionario), estos constituyen los períodos más críticos y más sensibles a la acción de los tóxicos, mediante este estudio podemos evaluar el crecimiento estructural, el desarrollo y la supervivencia de las crías solamente durante su estadio en el útero, este estudio es el único que debe realizarse en dos especies, una roedora preferiblemente la rata y una no roedora preferiblemente el conejo, el período de administración para este estudio corresponde desde la implantación (día 6 -7 de gestación) al cierre de la fisura palatina (día 15-18 de la gestación), el mismo, se corresponde con el primer trimestre del embarazo en el humano.

Los efectos adversos sobre el desarrollo pueden ocurrir debido a una exposición directa del embrión / feto al agente bajo estudio o pueden ocurrir de manera indirecta, debido a la toxicidad sobre la madre o por la placenta. La capacidad de una droga de producir o generar efectos tóxicos directos dependerá del grado de exposición embrio-fetal y el momento de la exposición respecto de los períodos sensibles del desarrollo. En los últimos tiempos se han desarrollado métodos alternativos para evaluar el potencial embriotóxico, estos métodos son: Embryonic stem cell test (EST) ESAC (2001), el Micromass assay Ex vivo ESAC (2002) y el Whole rat embryo assay Exvivo ESAC (2002). El más estudiado de los mismos, es el Embrionic stem cell test, el mismo utiliza como sistema experimental líneas celulares de ratón, Embrionic Stem Cells (D3), las cuales representan los tejidos embrionarios y la línea celular 3T3 Fibroblasts –

BALB/c 3T3 Clone 31 el cual representa los tejidos adultos. Permite caracterizar a los compuestos en embriotoxicos moderados, potentes o no embriotóxicos.

### **Inmunotoxicidad**

La guía ICH S8 Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceutical (Step 4), describe que: todos los nuevos productos farmacéuticos, deben ser evaluados respecto de la producción de inmunotoxicidad potencial, los métodos para evaluar la misma, incluyen los estudios estándar de toxicidad y si es apropiado deberían ser llevado a cabo estudios adicionales de inmunotoxicidad. La decisión de llevar a cabo estudios adicionales, es determinada basándose en el peso de la evidencia, a partir de la revisión de los resultados de los estudios de toxicidad estándar.

## **Estudios no clínicos de seguridad de los productos biofarmacéuticos**

En esta parte del capítulo nos referiremos específicamente a los anticuerpos monoclonales terapéuticos (AcM) y describiremos, de manera resumida, los aspectos más relevantes a tener en cuenta para evaluar la seguridad no clínica de los mismos.

Para el desarrollo o diseño de un programa destinado a la evaluación de la seguridad no clínica de los anticuerpos monoclonales, se debería considerar entre otros aspectos, su proceso de manufactura, pureza, secuencia, estructura e isotipo, efectos farmacológicos e inmunológicos, la biología del antígeno blanco y el uso clínico previsto (indicación, población de pacientes, régimen de dosificación, duración del tratamiento). Los anticuerpos monoclonales terapéuticos, exhiben generalmente una especificidad exclusiva por el antígeno blanco (esta característica diferencia a los mismos de las pequeñas moléculas terapéuticas), en general son efectivos y seguros, su toxicidad esta usualmente relacionada a una farmacología exagerada, su metabolismo es bien definido (catabolismo en amino ácidos), no pueden ser convertidos en intermediarios reactivos o metabolitos tóxicos, por su tamaño están limitados al espacio extracelular, no interactúan directamente con el ADN y no son directamente genotóxicos, se administran por vía parenteral, no se administran por vía oral a diferencia de las pequeñas moléculas terapéuticas, en la cual dicha vía es la más importante.

La Guideline ICH S6- Preclinical safety Evaluation of Biotechnology – Derived Pharmaceuticals y su Addendum to Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology – Derived Pharmaceuticals-2012., constituyen un punto de referencia para la evaluación de la seguridad preclínica de los anticuerpos monoclonales terapéuticos, esta guía, aplica a los **productos biofarmacéuticos**, los cuales podemos definir como: productos derivados de células caracterizadas a través del uso de una variedad de sistemas de expresión, los cuales incluyen: bacterias, levaduras, plantas, insectos y células mamíferas. Las indicaciones pueden incluir: diagnóstico *in vivo*, terapéuticas, o uso profiláctico. Las sustancias activas incluyen proteínas y péptidos, sus derivados y productos de los

cuales son componentes; pueden derivar de cultivos celulares o producidos utilizando tecnología ADN-recombinante, incluyendo la producción a partir de animales y plantas transgénicos (citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos monoclonales, etc.). Los objetivos de los estudios de seguridad no clínicos para este tipo de productos son los mismos que los descritos en el caso de las pequeñas moléculas terapéuticas.

### **Especie relevante**

La evaluación toxicológica de los AcM, debería ser llevada a cabo en una especie relevante (a diferencia de las pequeñas moléculas terapéuticas, donde la toxicidad es evaluada en una especie roedora y una no roedora), es decir, una especie en la cual el AcM es farmacológicamente activo, expresa el antígeno blanco o epítipo y presenta un perfil de reactividad cruzada similar al esperado en los tejidos humanos. La utilización de una especie relevante se fundamenta en que el mecanismo de toxicidad para los AcM está definido por una farmacología exagerada, de esta manera las especies relevantes farmacológicamente, pueden ser utilizadas también para evaluar la toxicidad biológica.

El programa de evaluación preclínico de seguridad, debería incluir normalmente dos especies relevantes, pero en determinados casos la utilización de una sola especie relevante puede ser aceptada. Cuando no se cuenta con una especie relevante, pueden utilizarse animales transgénicos que expresan el receptor humano o proteínas homologas.

### **Dosis: selección, frecuencia, vía**

Los niveles de dosis deberían seleccionarse de manera tal que las mismas provean suficiente información respecto de la relación *dosis- respuesta*, las mismas deberían incluir una dosis tóxica y una dosis que represente el NOAEL, la vía de administración debería ser la misma que la propuesta para el uso clínico, respecto de la frecuencia de administración, debería ser la misma que la propuesta para el uso clínico, sin embargo en algunos casos, es necesario una mayor frecuencia de administración, debido a un clearance más rápido en los animales del estudio (se detalla en inmunogenicidad).

### **Genotoxicidad**

Tal como se mencionó en los párrafos anteriores, los AcM no presentan las mismas propiedades de distribución que las pequeñas moléculas terapéuticas, no es esperado que atraviesen la membrana celular y nuclear para interactuar con el ADN. La batería de estudios de genotoxicidad descrito para las pequeñas moléculas terapéuticas no serían relevantes para este tipo de agente terapéutico, excepto que por las características del mismo sean requeridas.

### **Toxicidad a dosis repetida e Inmunogenicidad**

La duración de los estudios de toxicidad a dosis repetida debe estar justificada científicamente, para la mayoría de los productos biofarmacéuticos (AcM's), la duración general de los estudios de toxicidad a dosis repetida es entre 1 – 3 meses, en el caso de indicaciones cróni-

cas, estudios de 6 meses de duración son apropiados. Es muy importante destacar que, la administración de proteínas humanas en suficiente cantidad y de manera repetida a los animales, puede desarrollar en los mismos una respuesta inmunogénica, por esta razón, es de suma importancia medir la presencia de anticuerpos-anti-anticuerpo monoclonal terapéutico (anticuerpos neutralizantes), durante los estudios de toxicidad a dosis repetida, ya que la presencia de los mismos pueden afectar el perfil farmacológico y farmacocinético del producto en estudio, el cual impactará en los márgenes de exposición y la estimación de la toxicidad. Por otra parte, debemos resaltar que la formación de anticuerpos en los animales, no es considerado predictivo de un potencial desarrollo de anticuerpos en el ser humano.

### **Carcinogenicidad**

Este tipo de estudio en general es considerado inapropiado para los productos AcM,s y biofarmacéuticos en general, la realización del mismo debería ser evaluada en función de la población de pacientes, la duración del tratamiento y el mecanismo de acción, respecto de este último punto, aquellos productos biofarmacéuticos como por ejemplo inmunosupresores o factores de crecimiento, podrían aumentar la preocupación sobre el potencial carcinogénico de los mismos, en estos caso en función del peso de la evidencia se deberá definir la estrategia a llevar a cabo para evaluar el mismo.

### **Toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo**

Los estudios de toxicidad reproductiva, deberían ser conducidos o realizados de acuerdo con los principios o lineamientos de la guía ICH (S5) descrita anteriormente, sin embargo, el diseño específico del estudio y el esquema de dosificación, pueden ser modificados en base al mecanismo de acción, la especificidad de especie (ver más adelante), la inmunogenicidad y /o el comportamiento farmacocinético y la exposición embrio-fetal al producto en desarrollo. Para este tipo de estudio, es de preferencia (como en los estudios de toxicidad general) evaluar la toxicología sobre la reproducción en una sola especie relevante; si el candidato AcM's y biofarmacéuticos en general, es farmacológicamente activo en roedores y conejos, ambas especies deberían utilizarse para los estudios de evaluación de la toxicidad sobre el desarrollo embrio-fetal, excepto cuando se haya identificado teratogenicidad o letalidad embrio-fetal en una de las especies. Cuando los primates no-humanos (PNH), son la única especie relevante (es importante destacar que los primates no humanos no deben ser considerados las especies por default para evaluar este punto final toxicológico), los estudios para evaluar la toxicidad sobre el desarrollo, deberían ser realizados en esta única especie. En el caso de no existir una especie relevante, pueden utilizarse ratones transgénicos que expresan el receptor humano o proteínas homologas.

Los AcM's, por su tamaño ( $PM > 150000$  D), no pueden atravesar la placenta por difusión simple, sino que lo hacen a través de un mecanismo de transporte específico, el receptor Fc neonatal (FcRn), el cual determina la exposición fetal y el cual varía a través de las diferentes especies, por esta razón, cuando interpretamos los resultados obtenidos en los estudios de

toxicidad sobre el desarrollo, debemos considerar el perfil especie -específico de la exposición embrio- fetal durante la gestación, es decir las diferencias que existen entre los roedores y los PNH; en los últimos, los anticuerpos IgG's son transportados a través de la placenta durante el período fetal y su transferencia es baja durante la organogénesis, los AcM's, son secretados en la leche pero no son absorbidos a través del intestino neonatal, en cambio en los roedores los AcM's son transportados a través del saco vitelino durante los períodos embrionario y fetal, son secretados en la leche y son absorbidos a través del intestino neonatal. En función de lo descrito anteriormente, los estudios de toxicidad sobre el desarrollo deberían ser diseñados caso por caso, teniendo en cuenta el uso clínico propuesto, el tipo de molécula, la farmacología de la misma y exposición potencial del feto relacionado al desarrollo de los potenciales órganos blancos de toxicidad.

## **Estimación de la máxima dosis de inicio segura en los ensayos clínicos con fármacos terapéuticos en voluntarios adultos sanos**

Para finalizar este capítulo, nos vamos a detener en como utilizamos los datos obtenidos durante los estudios no clínicos o preclínicos de seguridad, para seleccionar la dosis máxima de Inicio recomendada en los estudios de primera administración en voluntarios humanos sanos. Para seleccionar esta dosis, existen dos guías o lineamientos a nivel regulatorio internacional, la guía de FDA-" *Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers*- Estimación de la dosis de inicio más segura en los ensayos clínicos iniciales con fármacos en voluntarios adultos sanos, publicada en el año 2005 y la *Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products*- Guía sobre estrategias para identificar y disminuir los riesgos en los ensayos clínicos de primera administración en humanos con fármacos de investigación." Publicada en el año 2007.

En este capítulo, nos referiremos únicamente a la guía de FDA, pero esto no significa que esta guía sea más importante que la guía de EMA la cual tiene su principal aplicación en los productos biofarmacéuticos como el caso de anticuerpos monoclonales terapéuticos.

La guía de FDA, propone para la selección de la dosis máxima de inicio recomendada en los estudios de primera administración en voluntarios humanos sanos un algoritmo de 5 pasos, el primer paso consiste en determinar los diferentes NOAEL's (obtenidos en los diferentes estudios de toxicidad realizados) en unidades de mg / Kg ( en este punto podemos observar una limitación de esta guía ya que no tiene en cuenta los parámetros farmacocinéticos que permiten evaluar los niveles de exposición), el segundo paso consiste en convertir los NOAEL's de cada especie en la Dosis Equivalente en Humanos (DEH), en el tercer paso debemos seleccionar la DEH de la especie más apropiada, en el paso 4 deberemos seleccionar un factor de

seguridad y posteriormente dividir la DEH por el mismo, una vez aplicado todos los pasos anteriores podemos establecer la Dosis Máxima de Inicio Recomendada (DMIR), el paso 5 del algoritmo considera un último ajuste a la DMIR, de acuerdo a una variedad de factores tales como: la dosis farmacológica activa, el escalado de dosis propuesto entre otros. A continuación aplicaremos el algoritmo a un ejemplo práctico: durante el desarrollo de los estudios de toxicidad a dosis repetidas de un nuevo agente terapéutico se seleccionaron los siguientes NOAEL's, 90 mg/kg para los estudios en rata y 30 mg/kg para la especie no roedora utilizada, en este punto convertimos los NOAEL's de cada especie en la DEH correspondiente:

$$\text{DEH} = 90 \text{ mg/kg} \times 0.16^* = 14.4 \text{ mg /kg}$$

$$\text{DEH} = 30 \text{ mg/kg} \times 0.54^* = 16.2 \text{ mg /kg}$$

(\*) estos factores de conversión se encuentran descritos en la guía de FDA

A partir de los valores obtenidos anteriormente, seleccionamos como DEH de la especie más apropiada la dosis de 14,4 mg / Kg, posteriormente aplicamos factor de seguridad de 10 (el mismo varía en virtud de diferentes factores), y obtenemos la DMIR,

DMIR= (14.4 mg / Kg) / 10 = 1.44 mg / Kg, a este valor obtenido podríamos aplicarle un último ajuste adicional en función de los descritos anteriormente.

## Conclusión

Durante el desarrollo de este capítulo, hemos descrito de manera sintética, algunos de los ensayos de toxicidad requeridos para la evaluación de la seguridad no clínica de productos farmacéuticos de uso humano, todos estos estudios nos permitirán llevar a cabo la evaluación del riesgo, el mismo constituye el proceso por el cual la información obtenida a partir de diferentes fuentes (ej: estudios *in vitro*, *in silico* e *in vivo*) son combinados para caracterizar una entidad molecular particular y seleccionar los compuestos más seguros, debemos recordar que el estudio de Seguridad No-Clínico debe ser adecuado para caracterizar los potenciales efectos tóxicos bajo las condiciones que soportarán los ensayos clínicos

## Referencias

- Aldridge, Norman, W. (1996). *Mechanisms and Concepts in Toxicology*. CrC. Taylor and Francis.
- Cavagnaro, Joy A. (2008). *Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals*. A Science-Based approach to Facilitating Clinical Trials.
- Buckley, L. Dorato, M. (2009). High dose selection in general toxicity studies for drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 54, 301–307.
- Hodgson Ernest. (2004). *A Textbook of Modern Toxicology*, Third Edition. Wiley –Interscience.

- Hood, Ronald. (2006). *Developmental and reproductive Toxicology. A Practical Approach*. Second Edition. CRS Pres. Taylor and Francis.
- Goodman & Gilman. (2014) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. XII Edición. Interamericana.
- Klaasen, C, Waakins, J. (2005). *III Fundamentos de Toxicología*, edición en español, revisada por M. Lopez-Rivadulla.
- Mudri, MD. Carballo, MA. (2006) *Genética Toxicológica*. Editorial De los Cuatro Vientos.
- Mulder J Gerard, Dencker Lennart. (2006) *Pharmaceutical Toxicology*. Pharmaceutical Press, ULLA (Postgraduate Pharmacy Series).
- Muller,P. Milton, M. Lloyd, P. Sims, J., Brennan, F. (2009). The minimum anticipated biological effect level (MABEL) for selection of first human dose in clinical trials with monoclonal antibodies. *Current Opinion in Biotechnology*. 20, 722–729.
- Net, Álvaro, Sant L, M. (2006). *Intoxicaciones Agudas Graves*. Ars Médica.
- Pauline L. Martin, Gerhard F. Weinbauer. (2010). Developmental Toxicity Testing of Biopharmaceuticals in Nonhuman Primates: Previous Experience and Future Directions. *International Journal of Toxicology* 29, 552-568.
- Repetto, M. (1997). *Toxicología Fundamental*, tercera edición, Editorial Díaz de Santos.
- Robinson, S. Delongas JL, Donald E, Dreher D, Festag M, Kervyn S, Lampo A, Nahas K, Nogues V, Ockert D, Quinn K, Old S, Pickersgill N, Somers K, Stark C, Stei P, Waterson L, Chapman K. (2008). A European pharmaceutical company initiative challenging the regulatory requirement for acute toxicity studies in pharmaceutical drug development. *Regulatory Toxicology Pharmacology*. 50 (3), 345-52.
- Shayne Cox Gad. (2008) *Preclinical Development Handbook- Toxicology*. Wiley –Interscience.
- Tabrizi, M. and Roskos, L. (2007). Preclinical and clinical safety of monoclonal antibodies. *Drug Discover Today*. 12, 13/14. 540-547.
- (2009) ICH M3 (R2)- *Non-Clinical Safety Studies For The Conduct Of Human Clinical Trials For Pharmaceuticals*.
- (2011) ICH S2 (R1)-*Guidance On Genotoxicity Testing and Data Interpretation For Pharmaceutical Intended For Human Use*
- (2005) ICH S5 (R2)- *Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility*.
- (2005) ICH S8 *Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceutical (Step 4)*.
- (2005) ICH S6- *Preclinical safety Evaluation of Biotechnology – Derived Pharmaceuticals*
- (2012) ICH S6 – *Addendum to Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology – Derived Pharmaceuticals*.
- (2008) *European Medicines Agencies. Concept Paper On Single Dose / Acute Toxicity*.
- (2005- 2007) *Curso Internacional de Experto y Master en Toxicología*, Universidad de Sevilla España, Ciclo lectivo 2005-2007.

# CAPÍTULO 9

## Interacciones medicamentosas

*Alicia E. Consolini y María Inés Ragone*

*Lo importante es no dejar de hacerse preguntas.*

ALBERT EINSTEIN

El objetivo principal de todo tratamiento farmacológico es obtener el mayor efecto benéfico con la menor incidencia de efectos indeseables y/o tóxicos. Sin embargo, el efecto que produce un fármaco en un paciente determinado está sujeto a numerosas variables por lo que resulta difícil predecir cuál va a ser la respuesta a un tratamiento formado por varios medicamentos.

En muchos casos la administración de la misma dosis de un fármaco a pacientes que padecen la misma enfermedad puede dar lugar a efectos dispares, o bien en un mismo paciente el cambio de alguna circunstancia de las que rodea al tratamiento puede también provocar efectos farmacológicos diferentes.

Los factores intrínsecos de cada paciente son aspectos que no se pueden modificar. En cambio, existen factores como las interacciones medicamentosas que pueden ser modificables durante la terapéutica. Estas interacciones no pueden ser siempre evitadas pero el conocimiento de la existencia de las mismas ayuda a que el equipo de salud influya durante el tratamiento de modo tal de evitar los potenciales riesgos que puedan producir.

La íntima relación entre dosis administrada y efecto farmacológico obtenido de un fármaco dado en un tratamiento puede separarse en componentes farmacocinéticos (desde la dosis a la concentración plasmática) y farmacodinámicos (desde la concentración plasmática al efecto) (Figura 1). Basándose en estos principios, el médico puede tomar en cuenta las diversas características patológicas y fisiológicas de un paciente particular en su respuesta al fármaco y mejorar así el tratamiento en general del mismo.

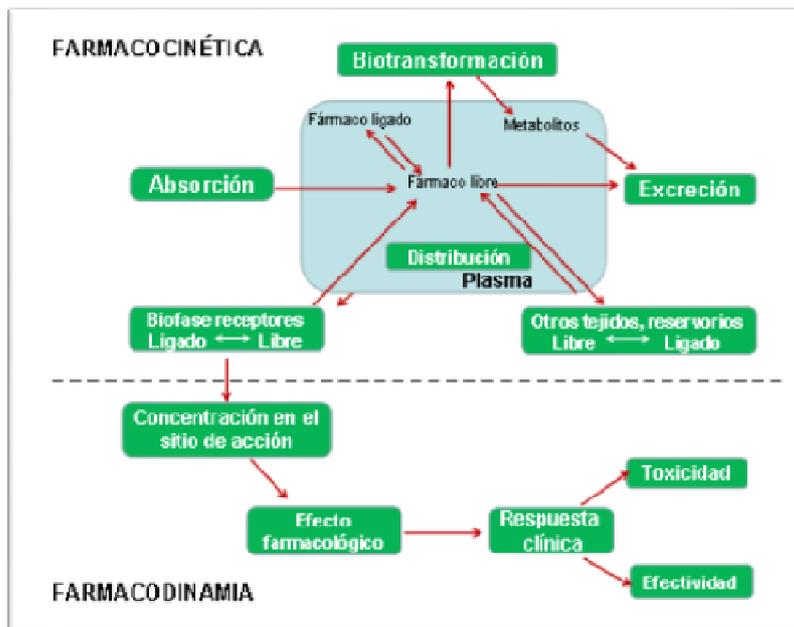


Figura 1: Componentes farmacocinéticos y farmacodinámicos luego de la administración de un fármaco.

## Interacciones de origen farmacocinético

El comportamiento farmacocinético de un fármaco puede alterar al de otro fármaco y esta interacción modificar por consiguiente su efecto farmacológico. Por lo tanto, es sumamente importante conocer los factores que afectan la farmacocinética de una droga en particular.

Cuando un fármaco ingresa al organismo se producen varios procesos antes, durante y después de su llegada al sitio de acción, que influyen en la producción del efecto (ver Figura 1, parte superior). Esos procesos comprenden la **absorción** desde el sitio de administración, la **distribución** en los líquidos corporales, la **metabolización** en hígado u otros tejidos, y finalmente la **excreción** o **eliminación** del organismo. La dinámica de dichos procesos determina las velocidades de cambio de la concentración plasmática y tisular del fármaco y sus metabolitos, y, por ende, sus efectos farmacológicos.

### Absorción

La absorción de un fármaco consiste en el pasaje del mismo desde el sitio donde es administrado hacia el plasma. Este parámetro puede ser descrito a través de una velocidad o mediante la **biodisponibilidad (F%)**. F% se define como la fracción del fármaco que llega inalterado a la circulación sistémica después de la administración por cualquier vía. El área bajo la curva de la concentración sanguínea de fármaco con el tiempo es una medida del grado de biodisponibilidad, normalizada por la dosis (Figura 2). Mientras que para una dosis intravenosa la F% es 1, para la vía oral la

biodisponibilidad es menor a 1. Esta caída en F% es debida a dos razones principales: la absorción incompleta del fármaco y su eliminación por metabolismo de primer paso.

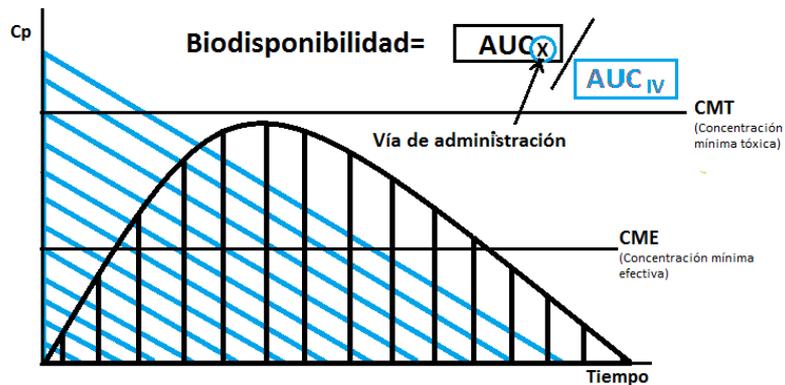


Figura 2: Esquema de la curva de niveles plasmáticos después de la administración oral de un fármaco (líneas negras). Comparación de AUC administración oral vs intravenosa (color).

La llegada del fármaco a la circulación sistémica puede estar restringida por la vía de administración del mismo, la cual influye en la latencia, intensidad y duración del efecto del fármaco administrado. La Figura 3 muestra cómo se modifica el perfil de la curva de concentración plasmática en función del tiempo con las distintas vías de administración.

Existen varias razones por las que en clínica se usan distintas vías de administración: por comodidad (administración vía oral de analgésicos en niños), para prolongar la duración de la absorción farmacológica (por ej. administración transdérmica en tratamientos de reemplazo hormonal en mujeres posmenopáusicas) o para evitar el efecto de primer paso (administración sublingual de nitrovasodilatadores coronarios). Por lo tanto, es de suma importancia conocer las ventajas y desventajas que poseen cada una de estas vías.

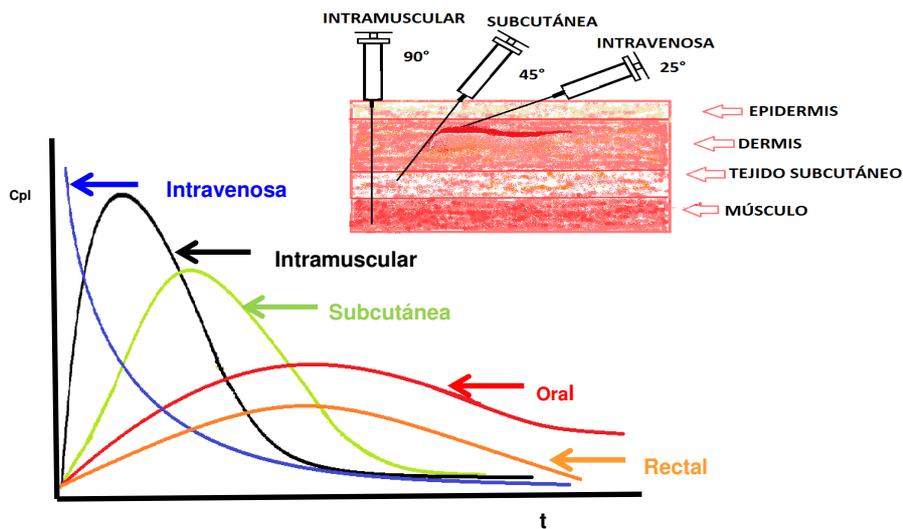


Figura 3: Comparación de perfiles de Cpl vs tiempo para diferentes vías de administración

## Vías de administración de fármacos- Generalidades, ventajas y desventajas

○ La vía de administración **oral** es la más cómoda y económica. El epitelio intestinal está especializado para la absorción, y por ende es donde se produce mayoritariamente la absorción de bases débiles (favorecida además por estar no-ionizadas al pH intestinal) como de ácidos (ionizados al pH intestinal). La absorción oral está influenciada por la **velocidad de vaciamiento gástrico**, la que a su vez depende de la ingesta simultánea o desfasada de alimento. Este demora el vaciamiento gástrico y por lo tanto la absorción en intestino. Las desventajas de esta vía son: disminución de la biodisponibilidad por acción de enzimas digestivas, emesis por irritación local, irregularidades en la absorción por presencia de alimentos o antiácidos.

○ La vía **sublingual** tiene muy alta biodisponibilidad dado que drena directamente en la vena cava superior (no tiene primer paso hepático) y constituye la vía ideal para fármacos liposolubles como la nitroglicerina.

○ La vía **rectal** constituye una alternativa útil en situaciones donde la administración oral está comprometida (por obstrucción o por emesis repetidas). La biodisponibilidad de esta vía es mayor que la oral dado que un 50% de la dosis evade el primer paso hepático, mientras que es menor que la vía sublingual o parenteral. La mayor desventaja radica en que la absorción puede ser errática.

○ La vía de administración más directa consiste en inyectar el fármaco en el torrente circulatorio sanguíneo. Esto puede llevarse a cabo por inyección **intravenosa** donde se evita el proceso de absorción (F= 100%). La **vía intravenosa** es exacta, rápida e ideal para la administración de soluciones irritantes como los citostáticos, y para grandes volúmenes, como las soluciones parenterales. En esta vía deben evitarse vehículos oleosos o hemolizantes y la infusión debe tener supervisión constante.

De manera alternativa a la vía intravenosa pueden utilizarse las *inyecciones subcutáneas, intramusculares, epidurales o intratecales*

○ En particular la vía **subcutánea** debe ser empleada sólo para compuestos no irritantes para evitar dolor intenso y necrosis del tejido. La absorción es constante y lenta y varía con la solubilidad del fármaco (por ej. distintos tipos de insulina), y con el tono de los vasos (por ej. noradrenalina demora la absorción y la difusión de un anestésico local).

○ La absorción de los fármacos por vía **intramuscular** es por lo general rápida, sin embargo puede hacerse más lenta utilizando un vehículo oleoso o un vasoconstrictor. Esta vía resiste sustancias más irritantes que la vía SC.

- *Las vías tópicas son una alternativa para varios tratamientos:*

La absorción por administración por **vía dérmica** depende directamente de la liposolubilidad del compuesto y de la superficie en que se aplique. La absorción en piel aumenta por ma-

ceración de la superficie cutánea (con curas húmedas u oclusivas) por erosión, inflamación, quemaduras, o frotamiento de la piel.

Por otra parte, la absorción por **mucosas** es útil para fármacos que experimentan una eliminación presistémica importante al ser administrados por vía oral. Es una vía rápida y con alta biodisponibilidad.

En particular la **vía ocular** que por lo general se emplea para acción local, puede tener absorción sistémica por drenaje a través del conducto nasolagrimal (por ej. los  $\beta$ -bloqueantes o inhibidores de la anhidrasa carbónica utilizados en glaucoma).

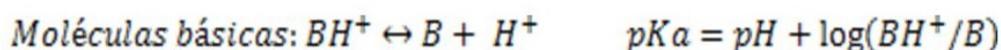
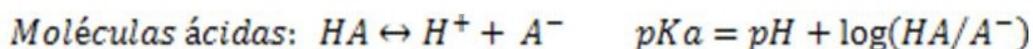
En el proceso de *absorción de los fármacos*, además de las vías de administración utilizadas, influyen tanto *factores químicos (dependientes del fármaco)* como *fisiológicos (dependientes del tejido)*.

Dentro de las variables químicas del fármaco a tener en cuenta encontramos la naturaleza química del mismo, su peso molecular, su solubilidad y su coeficiente de partición.

Por lo general, la mayoría de los fármacos son moléculas pequeñas que pasan a través de las membranas biológicas formadas por bicapas lipídicas. Este pasaje es realizado por difusión en su estado no cargado en contra de su gradiente de concentración. Esta transferencia es proporcional a la magnitud del gradiente de concentración a cada lado de la membrana y al coeficiente de partición. Este coeficiente relaciona la solubilidad del fármaco en un solvente apolar respecto a su solubilidad en agua o en un buffer fisiológico. Por lo tanto, cuanto más alto es el coeficiente de partición más rápidamente puede difundir la molécula del fármaco a través de las membranas lipídicas. Este pasaje ocurre hasta que se alcanza el estado estable donde la concentración del fármaco es igual a cada lado de la membrana.

Dado que la mayoría de los fármacos son ácidos o bases débiles, el pH del entorno donde el fármaco es liberado de su forma farmacéutica determinará la fracción disuelta y la forma no ionizada (liposoluble) que puede difundir a través de las membranas celulares. Esta fracción será función de la naturaleza química del fármaco, de su pKa y del pH local (figura 4)

La relación entre el pKa y el pH local está dada por la ecuación de Henderson –Hasselbach:



Teniendo en cuenta esto, los ácidos estarán cada vez más ionizados cuando estén expuestos a entornos químicos de pH opuesto al suyo. Mientras que ocurre lo inverso para las bases débiles.

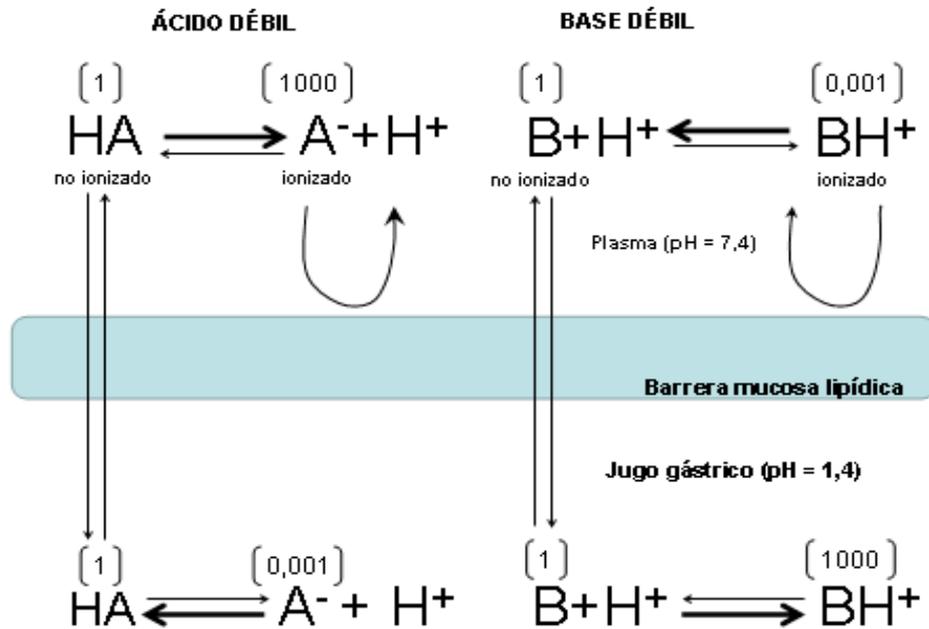


Figura 4: Efectos del pH en la distribución de un fármaco ácido o base débil.

Si bien la difusión pasiva por la bicapa lipídica predomina en la absorción de fármacos, existen moléculas que deben ser transportadas activamente a través de las barreras de la membrana por ser demasiado grandes o insolubles en lípidos. Para que este proceso ocurra existen transportadores selectivos, saturables y susceptibles a inhibición.

## Interacciones relacionadas con la absorción por vía oral

### a- Por cambios del pH o formación de complejos

Los fármacos que *aumentan el pH del estómago* y primera porción del intestino reducen la absorción de fármacos que se solubilizan en medio ácidos y de aquellos fármacos que son ácidos débiles dado que se encontrarán más ionizados en este entorno fisiológico (Tabla 1).

En algunos casos el pH alcalino puede alterar el revestimiento entérico de comprimidos orales. Por ejemplo, el **bisacodilo (laxante estimulante)** es formulado con cubierta entérica dado que es una sustancia muy irritante a nivel estomacal. La toma conjunta con fármacos que aumenten el pH estomacal puede causar grandes molestias gástricas y vómitos en los pacientes por pérdida de dicha cubierta.

**Tabla 1:** Fármacos que modifican pH estomacal y fármacos que modifican su absorción por cambios en el pH

Fármacos que modifican el pH estomacal	Fármacos cuya absorción es reducida por cambios de pH
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Anitiácidos o antiulcerosos:</i> magaldrato, hidróxido de aluminio y magnesio, sucralfato</li> <li>• <i>Fármacos anti H2:</i> ranitidina, famotidina</li> <li>• <i>Inhibidores de la bomba H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa:</i> omeprazol, lanzoprazol, esomeprazol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Necesitan medio ácido para disolverse:</i> ketoconazol, diazepam, ranitidina, cimetidina, indometacina, naproxeno, dexametasona</li> <li>- <i>Fármacos ácidos débiles:</i> sulfamidas, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, penicilina G.</li> </ul>

La formación de complejos de coordinación no absorbibles entre ciertos fármacos también constituye una interacción que interfiere con el proceso de absorción. Esto ocurre por ejemplo entre los **cationes aluminio y magnesio de antiácidos** o de los **suplementos de calcio e hierro** y fármacos como: **norfloxacina** u otras fluoroquinolonas, **tetraciclinas, sales de Fe, fenitoína, sulpirida, isoniazida, penicilamina, dicumarol, azitromicina.**

Otro caso de formación de complejos es el que produce **colestiramina** (resina de intercambio iónico) al fijar a fármacos como las **hormonas tiroideas, warfarina, digoxina, tiazidas, vitamina K** y los agentes que disuelven cálculos biliares **ursodiol y quenodiol**. Por ello, la administración de ambos tipos de fármacos debe desfasarse: los fármacos 1 hora antes de la colestiramina o 4 horas después.

El antihiperlipidémico **orlistat**, cuyo mecanismo es inhibir a la lipasa intestinal, inhibe la absorción de **vitaminas liposolubles (A, D, E y K).**

#### **b- Por cambios en la velocidad del vaciamiento gástrico**

La mayoría de los fármacos administrados por vía oral se absorben en el intestino delgado, por lo tanto la velocidad de vaciamiento gástrico influye en el grado y cantidad de absorción de un fármaco.

Los fármacos con acción proquinética (aceleran el vaciamiento gástrico), aceleran el paso de los medicamentos en la luz intestinal y por ende, dificultan la absorción.

Por otro lado aquellos fármacos que demoran el vaciamiento gástrico como los anticolinérgicos o estimulan la motilidad intestinal (como los laxantes) demoran la absorción de otros fármacos en el intestino (ver Tabla 2).

**Tabla 2:** Fármacos que influyen en el vaciamiento gástrico

<b>Aceleración del vaciamiento gástrico</b>	<b>Retrasan el vaciamiento gástrico</b>
Metoclopramida Domperidona Cisaprida Mosaprida Antibióticos macrólidos (eritromicina) Fármacos con acción colinérgica	Anticolinérgicos Antagonistas de calcio Antidepresivos tricíclicos Fenotiazidas Analgésicos opioides Antagonistas serotoninérgicos (ondasetrón)

Teniendo en cuenta esto podemos citar las siguientes interacciones a modo de ejemplo:

- metoclopramida interfiere en la absorción de digoxina y benzodiazepinas

- los anticolinérgicos demoran a levodopa disminuyendo la incidencia de efectos adversos de este tratamiento

### c- Efectos del alimento sobre la absorción oral

*El alimento por sí mismo retarda el vaciamiento gástrico y disminuye el pH gástrico.* Como se discutió anteriormente el cambio de pH aumenta la absorción de fármacos que se disuelven y absorben en medio ácido como: **ketoconazol y derivados, espironolactona, nitrofurantoína.**

Por retardar el vaciamiento gástrico, el alimento demora la absorción de **L-dopa** (que además compite con los aminoácidos en el transporte intestinal y disminuyen los efectos colaterales), de **digoxina**, de **aspirina**, de **indometacina**, de **lincomicina**, de **paracetamol**, de **propoxifeno**, de **eritromicina**, de **didanosina**, de **tacrina**, de **astemizol**, de **azitromicina** y otros antibióticos.

El alimento también puede formar complejos insolubles o reaccionar (a través de la presencia de taninos, aminoácidos, hidratos de carbono, fosfatos,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ , etc.) con ciertos fármacos como **sales de hierro, tetraciclinas, eritromicina y azitromicina, fluoroquinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina), isoniazida**, disminuyendo su biodisponibilidad. También puede adsorber a las partículas de fármaco, como sucede con la **ampicilina**, disminuyendo su absorción.

Una comida rica en grasas puede aumentar la biodisponibilidad de **teofilina** haciéndola muy tóxica, o puede aumentar la solubilidad de compuestos liposolubles como el antifúngico **griseofulvina** y por ende, mejorar su absorción.

Alimentos ricos en tiramina (quesos estacionados, cervezas, etc.) generan una reacción hipertensiva en pacientes tratados con antidepresivos tipo **inhibidores de la MAO tipo A (tranilcipromina, selegilina, moclobemida) e isoniazida (antibiótico utilizado para el tratamiento de la tuberculosis)** y en menor medida por inhibidores de la **MAO B (selegilina)**. La interacción se debe a que cuando la MAO-A ubicada a nivel de las microvellosidades intestinales se encuentra inhibida, la tiramina ingerida en grandes cantidades es absorbida y mediante la circulación accede a ser recaptada como amina indirecta en la terminales adrenérgicos de los vasos, por lo cual puede generar un pico hipertensivo y reducir la efectividad de los fármacos antihipertensivos.

El alimento puede alterar la velocidad de metabolización de fármacos. Por ejemplo, dietas ricas en proteínas aumentan el metabolismo hepático de **teofilina**, además de disminuir su absorción, el alimento parece disminuir el metabolismo de primer paso hepático del **propranolol y metoprolol** con lo que aumenta su biodisponibilidad.

Por lo antedicho, conviene **administrar junto con las comidas** a: ketoconazol y derivados, nitrofurantoína y espironolactona (porque se favorece la absorción en el medio ácido), L-dopa (por reducir efectos adversos), propranolol, metoprolol y sinvastatina (mayor F% porque se reduce el metabolismo de primer paso hepático), griseofulvina y albendazol (se absorben mejor con comidas grasas).

Por el contrario, conviene **administrar lejos de las comidas (1 a 2 hs. antes o después)** a: digoxina, sales de Fe, tetraciclinas, teofilina, macrólidos (excepto claritromicina), fluoroquinolonas, ampicilina, aspirina (excepto que se busque disminuir la irritación gástrica), indometacina, IMAO's, isoniazida, lincomicina, paracetamol, propoxifeno, penicilina G, eritromicina, didanosina, tacrina, azitromicina.

Otro grupo de fármacos que presenta interacciones respecto a la toma con alimentos es el de los fármacos para tratar la infección con HIV (**antiretrovirales**). Algunos de ellos son:

- a) **no deben tomarse con alimento:** didanosina (ddl), indinavir (IDV) y amprenavir (APV) (éste último debe alejarse de las grasas)
- b) **conviene administrar con comidas** (porque aumenta su F%): ritonavir (RTV), saquinavir (SQV), nelfinavir (NFV), lopinavir+ritonavir (LPV+RTV), atazanavir (ATZ)
- c) **es indistinto tomar con comidas:** abacavir (ABC), delavirdina (DVD), efavirenz (EFV), lamivudina (3TC), nevirapina (NVP), estavudina (d4T), zalcitabina (ddC), zidovudina (AZT), emtricitabina (FTC)

## Distribución

Luego de que un fármaco es absorbido, éste se distribuye en los líquidos intersticiales y celulares. La distribución propiamente dicha de un fármaco en el organismo refleja diferentes factores de la molécula en cuestión, ya sean factores que dependen del fármaco en sí como son las propiedades fisicoquímicas o factores fisiológicos.

Este proceso puede involucrar varias fases. La **fase inicial** depende del gasto cardíaco y en ella el fármaco llega a los órganos más irrigados: corazón, hígado, riñón (el primer lugar donde llega el fármaco tras su absorción).

Luego de unos minutos, se produce la **segunda fase** en la que el fármaco llega a tejidos menos irrigados como piel, vísceras, músculo y tejido adiposo, proceso que toma horas.

La llegada a cerebro es más lenta y está determinada por *la liposolubilidad del fármaco*, lo cual le permite atravesar por difusión simple la barrera hematoencefálica (BHE) que es lipídica. Esta barrera restringe el pasaje de moléculas desde el plasma al SNC, ya que las células endoteliales de los capilares carecen de poros intercelulares y de vesículas pinocitóticas. Por el contrario, en esta barrera predominan las uniones estrechas con las células de la glia, que solo pueden ser atravesadas por difusión simple. Esta es la vía de pasaje a la BHE de los compuestos liposolubles, tal como los fármacos de acción central (anfetaminas, pseudoefedrina, antidepresivos tricíclicos, IMAO's, antipsicóticos, l-dopa, analgésicos opioides, antiepilépticos). En cambio, compuestos hidrofílicos o cargados no pueden atravesar la BHE y por lo tanto no alcanzan el SNC, excepto en condiciones en que la barrera se permeabiliza como en la inflamación meníngea o encefálica (situación en que la penicilina G, hidrofílica, puede ser aplicada en asociación a otros antibióticos).

Pasada esta etapa, a menudo, se produce una **redistribución (tercera fase)** entre cerebro y tejido adiposo, que pasa a actuar como reservorio. Los compuestos acumulados en músculo esquelético (como benzodiazepinas y cardiotónicos), en tejido adiposo (como barbitúricos,

benzodiazepinas, y cardiotónicos), hueso (tetraciclinas), hígado (quinacrina), o proteínas plasmáticas (sulfas, furosemida, salicilatos, entre varios otros) están en equilibrio con el fármaco libre en plasma (Figura 5) Esto prolonga el efecto farmacológico al liberarse el fármaco del depósito cuando el fármaco plasmático se elimina.

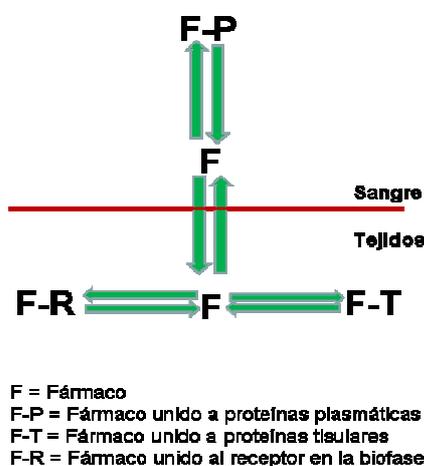


Figura 5: Redistribución de fármaco (equilibrio fármaco -plasma-tejidos)

El espacio en el que se distribuye un fármaco se conoce con el nombre de *volumen aparente de distribución* (Vd). El Vd relaciona la dosis administrada de fármaco con la concentración del mismo en el plasma circulante ( $Vd = \text{Dosis} / C_{pl}$ ). Este volumen es un volumen teórico que no coincide con ningún espacio anatómico real y da idea de la fijación del fármaco a diferentes tejidos. Cuando el Vd es considerablemente mayor al peso corporal es una indicación de que el fármaco posee una amplia fijación a los tejidos (ya que la Cpl es baja). Tanto el lugar de acción de un fármaco como la masa de tejido en la cual se concentra dicho fármaco tienen que ser consideradas para determinar la importancia clínica de esa localización. Puesto que el Vd constituye una variable farmacocinética, el valor del mismo depende de cada fármaco en particular. En la Tabla 3 se muestran ejemplos del volumen de distribución de algunos fármacos.

**Tabla 3:** Ejemplos de volúmenes de distribución de diferentes fármacos

	<b>Volumen de distribución (l/kg)</b>	<b>Fármaco</b>
Plasma (0,05 l/kg)	0,05- 0,1 0,1-0,2	Insulina – Heparina Furosemida - Warfarina
Líquido extracelular (0,2 l/kg)	0,2-0,4	Amikacina
Agua corporal total (0,55 l/kg)	0,55-0,1 1-2 2-5 >10	Fenitoína- Fenobarbital Indometacina- Diazepam Morfina- Digoxina- Imipramina Nortriptilina

*El sitio de afinidad más común de los fármacos son las proteínas plasmáticas.* Los fármacos con carga negativa se unen a la albúmina plasmática, mientras que los básicos se unen a la alfa1-globulina. La unión a proteínas plasmáticas limita la excreción por filtración glomerular, ya que sólo se filtra el fármaco libre, con lo cual la unión a albúmina requiere la disociación gradual y por ello

demora la eliminación. En cambio, no afecta la velocidad de secreción tubular (ver sección posterior: Excreción)

El número de puntos de unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas es limitado y la propia naturaleza de esta unión hace que fármacos distintos compartan los mismos sitios de fijación y puedan competir por ellos.

## Interacciones por desplazamiento en la unión a proteínas plasmáticas

Si dos drogas se unen a la misma proteína plasmática pueden competir por la unión al mismo sitio (desplazamiento competitivo) o una de ellas afectar la unión de la otra (desplazamiento no-competitivo) durante la administración de ambos fármacos en un período común de tratamiento. La interacción se da en el plasma, por lo cual es independiente del tiempo transcurrido entre la administración (oral o parenteral) de los dos fármacos durante el día. La consecuencia es que cada uno de los fármacos aumentará su concentración plasmática respecto a lo que ocurriría si se administrara solo, aumentándose fundamentalmente la concentración plasmática (Cpl) del fármaco que se tomaba inicialmente y que es desplazado de su unión. Esto es particularmente importante en el caso de fármacos unidos en >90% a proteínas, que tienen muy baja concentración plasmática de fármaco libre. El otro factor que lo acrecienta es si el fármaco desplazado tiene bajo Vd, ya que entonces la fracción desplazada ejerce un aumento considerable en la Cpl. Esto puede provocar potenciación de efectos o toxicidad del fármaco desplazado, y es particularmente importante en los fármacos de bajo margen de seguridad o rango terapéutico.

En los siguientes párrafos se citarán algunos ejemplos:

### Entre los fármacos afines a albúmina:

- La **fenilbutazona**, el **ácido mefenámico**, el **ácido etacrínico**, el **ácido nalidíxico**, los **salicilatos**, las **sulfonamidas** tienen mayor afinidad por la albúmina que la **warfarina**, por lo que la desplazan, aumentando la actividad anticoagulante con riesgo de hemorragia especialmente entre las 24 horas y 5 días de la toma.
- Los **salicilatos** desplazan de su unión al **metotrexato** aumentando su toxicidad hepática y en la serie eritrocítica, y a los hipoglucemiantes tipo **sulfonilureas clorpropamida, glibenclamida, glipizida y glimepirida** potenciando su acción hipoglucemiante.
- Las **sulfonilureas** aumentan inicialmente los niveles plasmáticos del anticoagulante oral **acenocumarol** por desplazarlos de su unión a albúmina potenciando la hipoprotrombinemia.
- El **ácido valproico** desplaza de su unión a la **fenitoína**, aumentando el riesgo de efectos adversos, por lo que se aconseja no asociarlos en la terapia antiepiléptica.
- Los hipolipemiantes **clofibrato, fenofibrato** y el diurético **furosemida** compiten por los mismos sitios de fijación a la albúmina, por lo que el segundo puede potenciar a los primeros, y en hipoalbuminemia se potencian ambos fármacos (con riesgo de rigidez muscular y diuresis).

- Las **sulfamidas** (como sulfametoxazol, componente del Bactrim) desplazan de su unión a albúmina a **metotrexato**, potenciando su toxicidad hepática y en eritrocitos, a **anticoagulantes orales** con riesgo de hemorragias, y a **hipoglucemiantes y fenitoína**, potenciando sus efectos.

#### Entre los fármacos afines a alfa1-gluco proteína sérica:

- La **carbamezepina** compite con **propranolol** por la unión, con posible potenciación del efecto beta-bloqueante y estabilizante de membrana de propranolol (bradicardia), o excesiva sedación de la carbamazepina.

## Metabolismo

La metabolización de un fármaco es esencial para que cese su actividad biológica y que pueda ser eliminado por los sistemas de excreción porque ha adquirido características más hidrofílicas que las originales. Las reacciones de metabolización ocurren en algún sitio del organismo desde el momento en que se absorben hasta que llegan a la circulación general y a la eliminación renal o biliar (Figura 6). Algunas de estas transformaciones ocurren en la luz o en la pared intestinal, mientras que la mayoría de ellas ocurren en el hígado.

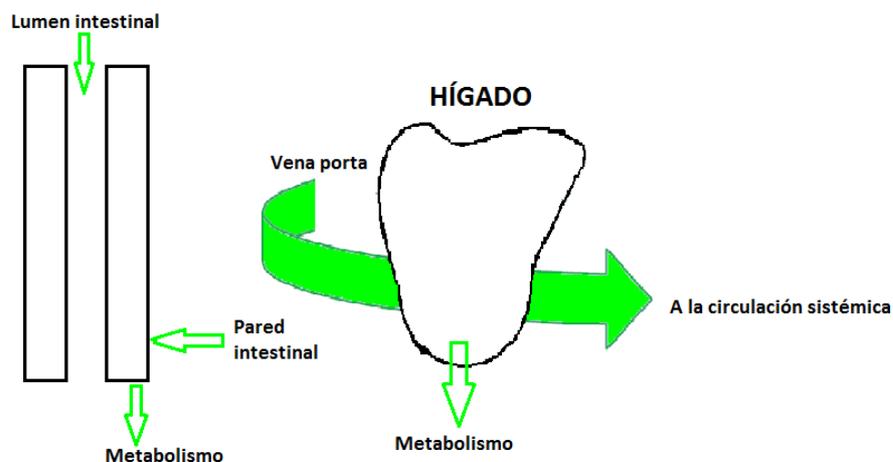


Figura 6: Sitios de metabolización de fármacos

Los productos obtenidos de la metabolización de fármacos por lo general tienen menor actividad farmacológica que el fármaco de origen o carecen de ésta. Sin embargo, algunos metabolitos tienen mayor actividad biológica o efectos tóxicos. En ciertos casos con los denominados profármacos, el fármaco es inicialmente activado por el sistema metabolizador hepático (por ej. **enalapril** a enalaprilato)

La metabolización hepática abarca dos tipos de reacciones:

**Reacciones de fase I o de funcionalización:** son reacciones que confieren un grupo funcional al fármaco con el fin de aumentar la polaridad del mismo. Ejemplos: reacciones oxidativas (N-desalquilación, O-desalquilación, hidroxilación alifática y aromática, N-oxidación, S-

oxidación, desaminación), reacciones de reducción (de C, N o S), reacciones de hidrólisis (de ésteres o amidas), reacciones de hidratación (de epóxidos).

**Reacciones de fase II:** Son reacciones de conjugación o síntesis en las que un grupo químico voluminoso y rico en grupos hidrofílicos se fija a la molécula confiriéndole hidrosolubilidad, lo que facilitará posteriormente su excreción (glucuronidación, sulfatación, acetilación).

Los sistemas enzimáticos hepáticos de metabolización están situados en el retículo endoplasmático (fase I) y en el citosol (fase II) de la célula hepática. Comprenden al complejo del citocromo P-450 y a la NADPH-reductasa. Estos oxidan al fármaco a expensas de oxígeno molecular. El citocromo P-450 presenta polimorfismo genético, es decir existen varias familias de genes para el mismo que determinan diferentes especificidades de sustratos. De estas familias hay 6 isoenzimas implicadas en el metabolismo de fármacos: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 Y CYP3A4 (más importante). El estudio de las isoenzimas que metabolizan a cada fármaco está en continua evolución, y se siguen encontrando fármacos que inhiben y otros que inducen a las diversas isoenzimas (Tabla 4). Por ello, muchas veces aparecen en bibliografía nuevas selectividades.

**Tabla 4:** Resumen de algunos fármacos que utilizan como sustrato, inducen o inhiben a isoenzimas particulares del sistema de citocromos P450.

Citocromo	Fármaco	
CYP2E1	Sustrato	Teofilina, paracetamol, cafeína
	Inhibidores	Disulfiram
	Inductores	Etanol, isoniacida
CYP1A2	Sustrato	Paracetamol, imipramina, teofilina, warfarina
	Inhibidores	Ciprofloxacina
	Inductores	Omeprazol
CYP2C9	Sustrato	Fenitoína, pentobarbital, celecoxib, sulfonilureas
	Inhibidores	Sulfinilpirazona, omeprazol
	Inductores	Rifampicina
CYP2C19	Sustrato	Citalopram, diazepam, omeprazol, propranolol, sulfonilureas
	Inhibidores	Fluconazol, omeprazol
	Inductores	Rifampicina
CYP2D6	Sustrato	Citalopram, propranolol, tamoxifeno, fluoxetina, haloperidol, flecainida, amiodarona
	Inhibidores	Fluoxetina, sertralina, trifluorperidol, amiodarona
	Inductores	---
CYP3A4	Sustrato	Indinavir, saquinavir, ritonavir, diazepam, imipramina, verapamil, warfarina
	Inhibidores	Verapamil, fluconazol, fluoxetina, ritonavir, indinavir, saquinavir
	Inductores	Carbamacepina, fenitoína, rifampicina, hierba de San Juan ( <i>Hypericum perforatum</i> )

En el **feto** y en el **recién nacido** las actividades de los sistemas enzimáticos son bajas, lo cual contribuye a la hiperbilirrubinemia y al riesgo de encefalopatía inducida por bilirrubina. También el metabolismo es el origen de la mayor toxicidad de ciertos fármacos como **cloranfenicol** y **opioides como codeína** (que se metaboliza a **morfina**). Las enzimas del citocromo P-450 maduran luego de algunos meses de vida, mientras las de conjugación lo hacen más lentamente. En los **ancianos** puede haber disminución de la actividad enzimática, pero en general es heterogénea y menos importante que en el recién nacido.

## Interacciones por alteraciones en el metabolismo

### a- Inducción enzimática

Muchos fármacos pueden aumentar la velocidad enzimática del sistema metabolizador hepático, probablemente por acelerar la síntesis de enzimas y por ende el número de enzimas participantes del proceso. Así aceleran la degradación metabólica de otros fármacos. Esto ocurre con **fenobarbital, fenitoína, carbamazepina y rifampicina**, que en general son inespecíficos para las varias isoenzimas de CYP450. Las interacciones de mayor importancia clínica son:

- El **fenobarbital** y la **carbamazepina** pueden aumentar la degradación de **warfarina**, disminuyendo la respuesta al anticoagulante, lo cual requiere un aumento de dosis de éste para evitar la formación de trombos y reducción de la misma al suspender el fenobarbital. El efecto inductor es evidente dentro de los 2 a 5 días de administración conjunta y se restablece la actividad enzimática normal en 2 a 3 semanas.

- Los inductores como **carbamazepina, rifampicina, fenitoína y fenobarbital** reducen las concentraciones plasmáticas de los **estrógenos y progestágenos** que componen los **anti-conceptivos orales**. Dado que estas hormonas se administran en baja dosis para minimizar los efectos colaterales, es posible la pérdida de efecto que se manifiesta en hemorragia intermenstrual por supresión del nivel de estrógenos.

- Los inductores como **fenobarbital, rifampicina o fenitoína** reducen la vida media de los **glucocorticoides** como **dexametasona o prednisona**, lo cual conduce a riesgo de broncoespasmo en pacientes asmáticos tratados.

- El uso crónico de anticonvulsivantes como **fenobarbital o fenitoína** ha conducido a casos de raquitismo y osteomalacia por deficiencia de **vitamina D** al aumentar la degradación de ésta, sobre todo si la ingesta es deficiente.

- El antibiótico **rifampicina** reduce las concentraciones plasmáticas de otros fármacos como **quinidina, ketoconazol, propranolol, metoprolol, clofibrato y sulfonilureas**.

- El antifúngico **griseofulvina** aumenta el metabolismo de **warfarina y anticonceptivos orales**, disminuyendo sus efectos terapéuticos.

- El **tabaco** en los fumadores crónicos disminuye las concentraciones plasmáticas y por ende el efecto de fármacos como **propranolol** (con necesidad de una dosis mayor en fumadores

que en no fumadores, para evitar la pérdida de efectos), como **clorpromazina y otras fenotiazinas y clozapina** (pérdida del control antipsicótico), los analgésicos opioides **propoxifeno y pentazocina** (pérdida de analgesia), **teofilina** (riesgo de broncoespasmo), **diazepam y anti-depresivos tricíclicos** (se reduce el control de ansiedad y crisis de pánico). En fumadoras se aumenta mucho el riesgo de efectos cardiovasculares graves como infarto de miocardio en mujeres tratadas con **anticonceptivos orales**.

- Se ha indicado que la acumulación de hidrocarburos policíclicos en la **carne asada al carbón** aumenta mucho la metabolización de fármacos, entre ellos la **teofilina** en pacientes que consumen grandes cantidades de carne asada.

- El jugo de pomelo induce el metabolismo de CYP1A2 y por ello reduce la Cpl de **losartán**

- El **alcohol** puede estimular o inhibir el metabolismo hepático. Por administración **crónica** en alcohólicos induce el metabolismo por citocromos, acelerando la degradación de **sulfonilureas, warfarina y fenitoína**. En cambio el uso agudo de alcohol en pacientes no alcohólicos puede disminuir el metabolismo de otros fármacos, por competir con los CYP-P450 en la degradación, potenciando sus respectivos efectos (ver luego).

- La **piridoxina (vitamina B6)** antagoniza la acción de **levodopa** por acelerar su decarboxilación a dopamina a nivel periférico. Sin embargo, la asociación de levodopa con **carbidopa** (que inhibe la decarboxilación) bloquea la acción periférica de la piridoxina, permitiendo el pasaje de la levodopa a nivel central, y así evitando la interacción en pacientes parkinsonianos.

- **Entre los anticonvulsivantes** se dan varias interacciones a nivel metabólico, por lo que no es conveniente asociarlos:

- \* **Fenobarbital** aumenta el metabolismo de **fenitoína** a dosis intermedias, y en dosis alta compete por el metabolismo produciendo riesgo de toxicidad.

- \* **Fenobarbital** aumenta el metabolismo de **carbamacepina**

- \* **Primidona** es una prodroga que se biotransforma a **fenobarbital**, por lo que se produce toxicidad si se administra junto con **fenobarbital**.

## **b- Interacciones por inhibición enzimática**

Hay fármacos como **cimetidina, omeprazol, ketoconazol, itraconazol, eritromicina, azitromicina, ciprofloxacina, omeprazol, fluoxetina, entre otros**, que inhiben el metabolismo hepático de ciertas isoenzimas más o menos selectivamente, algunos de ellos sobre varias isoenzimas. La consecuencia es que si llegan a una manifestación clínica se potenciarán los efectos o la toxicidad de otros fármacos que son sustratos de dichas isoenzimas. En la acción inhibidora ocurren mecanismos competitivos y no competitivos, muchos aún sin precisar. Por ello es el grupo de interacciones farmacocinéticas más variable y con más tasa de progreso en el conocimiento. Al momento, las interacciones de mayor importancia clínica son:

- Los antibióticos macrólidos **eritromicina, y claritromicina**, los antifúngicos azoles **ketoconazol e itraconazol**, las fluoroquinolonas **ciprofloxacina y ofloxacina**, los inhibidores de proteasas **saquinavir y ritonavir**, y las estatinas (**sinvastatina y atorvastatina**) (todos inhibidores del CYP3A4 y algunos del CYP1A2) aumentan las concentraciones plasmáticas de **teofi-**

**lina**, de **carbamazepina**, del proquinético **cisaprida**, del antiepiléptico **fenitoína**, del inmunosupresor **ciclosporina**, del hipoglucemiante **repaglinida** y de los **bloqueantes cálcicos diltiazem, verapamilo, y dihidropiridinas**, con los respectivos riesgos de toxicidad.

- Los inhibidores del metabolismo hepático de CYP3A4 **eritromicina y claritromicina, ketoconazol, itraconazol, diltiazem**, y las estatinas (**sinvastatina y atorvastatina**), y los inhibidores del CYP1A2 (**ciprofloxacina y macrólidos**) y el inhibidor del CYP2C9 **omeprazol** aumentan las concentraciones plasmáticas del **anticoagulante warfarina** (con su isómero S sustrato del CYP2C9, y el R sustrato de CYP1A2, y ambos isómeros también sustratos de CYP2C19 y CYP3A4), del anticoagulante **acenocumarol** (sustrato del CYP3A4) y de antiagregantes plaquetarios como **cilostazol y clopidogrel** (sustratos de CYP2C19 y CYP3A4), con el consecuente riesgo de hemorragias.

- Los inhibidores del CYP2C19 (**fluvoxamina, fluoxetina, paroxetina, ticlopidina, sertralina, ritonavir y omeprazol**) potencian los respectivos efectos de los **antidepresivos tricíclicos**, de **propranolol**, y en parte de las **sulfonilureas**

- Los inhibidores del CYP2C9 (**Fluvoxamina, amiodarona, fluconazol**) potencian los efectos de **diltiazem** y los **hipoglucemiantes sulfonilureas y rosiglitazona**, e inhiben la formación del metabolito activo de **losartán** reduciendo su efectividad.

- La inhibición del CYP2D6 (**fluoxetina, sertralina, paroxetina**, y los más débiles inhibidores **venlafaxina, nefazodona, amiodarona, sulfas, fluvastatina, tioridazina, haloperidol, celecoxib, fluconazol**) potencian los efectos de otros fármacos de acción central (**antidepresivos tricíclicos, IRSS, antipsicóticos, opioides como codeína, fenitoína**) y de algunos antiarrítmicos (**amiodarona, flecainida, propafenona**).

- Dos antiepilépticos como **fenobarbital y valproato** no deben asociarse, ya que el segundo inhibe el metabolismo del primero aumentando un 40% la concentración plasmática. Además, el **valproato** inhibe el metabolismo de **fenitoína**, con riesgo de toxicidad hepática.

- El antibiótico **cloranfenicol** inhibe en forma irreversible a las enzimas hepáticas (efecto tóxico) potenciando la acción de **warfarina, fenitoína, clorpropamida y otras sulfonilureas**.

- Los **antidepresivos tricíclicos, fluoxetina, paroxetina** y otros inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), y las **fenotiazinas** inhiben mutuamente su biotransformación, por lo que potencian tanto sus efectos antipsicóticos y antidepresivos como sus efectos colaterales (sedación, efectos antimuscarínicos e hipotensión).

- El **jugo de pomelo** posee un heterósido llamado naranjina que es el responsable de la inhibición del CYP3A4 mayoritariamente de las microvellosidades intestinales y algo del hepático. Por ello aumenta las concentraciones plasmáticas y efecto de **ciclosporina** y de las **dihidropiridinas** al reducir su metabolismo de primer paso a ambos niveles.

- El **alcohol** en alta dosis aguda en individuos no alcohólicos compite por el sistema metabolizador hepático (CYP3A4 y etanol-deshidrogenasa), disminuyendo el metabolismo de otros fármacos metabolizados por CYP3A4, y de ciertas **cefalosporinas (cefamandol, cefametazol, cefoperazona, cefotetán)**. Puesto que esas cefalosporinas tienen grupos –SH se produce una reacción tipo disulfiram (náuseas, vómitos) por acumulación de acetal-

dehido en plasma, cuando se ingieren simultáneamente con alcohol y durante 72 hs. posteriores a la administración del antibiótico..

- El **alcohol** en alta dosis potencia la acción hipoglucemiante de **sulfonilureas (clorpropamida)** por disminuir su metabolismo (interacción farmacocinética), además de inhibir por sí mismo la gluconeogénesis (interacción farmacodinámica).

- En otro sistema enzimático: el antigotoso **alopurinol** inhibe la xantino-oxidasa y también el metabolismo de drogas potencialmente tóxicas como los análogos de purinas antineoplásicos e inmunomoduladores **mercaptapurina y azatioprina**, por lo que se aconseja reducir las dosis de estas últimas.

## Excreción

Los fármacos son eliminados del organismo, ya sea intactos o como metabolitos. Aunque el riñón es el órgano excretor por excelencia, también pueden eliminarse fármacos por otras vías como la bilis, el sudor, leche materna, pulmones, etc (Figura 7). Una medida de la velocidad de eliminación o depuración de un fármaco en el organismo es el "clearance" (Cl) o aclaramiento. Este parámetro relaciona el volumen de distribución ( $Vd$ ) del fármaco con la duración media o vida media ( $t_{1/2}$ ) del mismo en el organismo, a través de la constante de eliminación ( $K_{el}$ ).

$$Cl_{plasmático} = Vd \cdot K_{el} = Vd \cdot \ln(2) / t_{1/2}$$

Cuando se suman todas las vías de eliminación separadas el resultado es la eliminación sistémica:  $Cl_{plasmático} = \sum Cl_{individuales}$

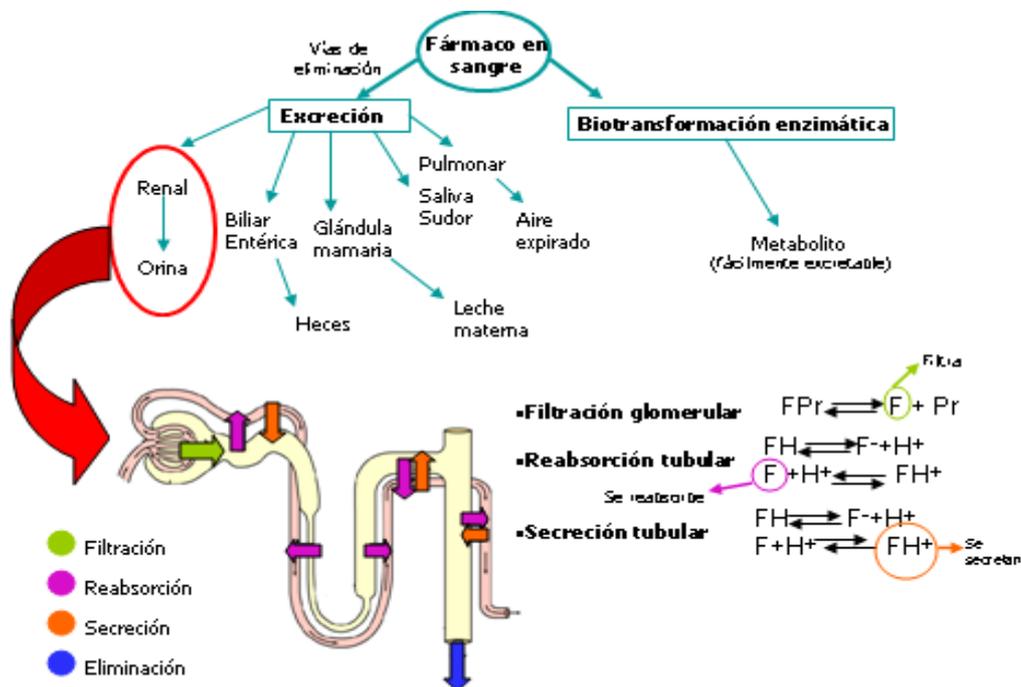


Figura 7: Vías de excreción de fármacos

La **excreción renal** implica tres procesos: filtración glomerular, secreción tubular activa y reabsorción tubular pasiva (Figura 7, parte inferior).

La cantidad de **fármaco filtrada** depende de la fracción de fármaco **no unido a proteínas plasmáticas**, ya que las proteínas no son filtrables en el glomérulo (por lo que su lenta disociación es limitante de la filtración), y de la **velocidad de filtración glomerular** (dependiente de factores de presión hidrostática y oncótica).

A medida que el filtrado pasa por los túbulos proximal y distal, las formas no ionizadas de los ácidos y las bases débiles sufren **reabsorción pasiva neta** por gradiente de concentración y dependiendo del **pH urinario**. Cuando la orina tubular se alcaliniza se reabsorben las bases, y cuando la orina se acidifica se reabsorben los ácidos débiles (Figura 8)

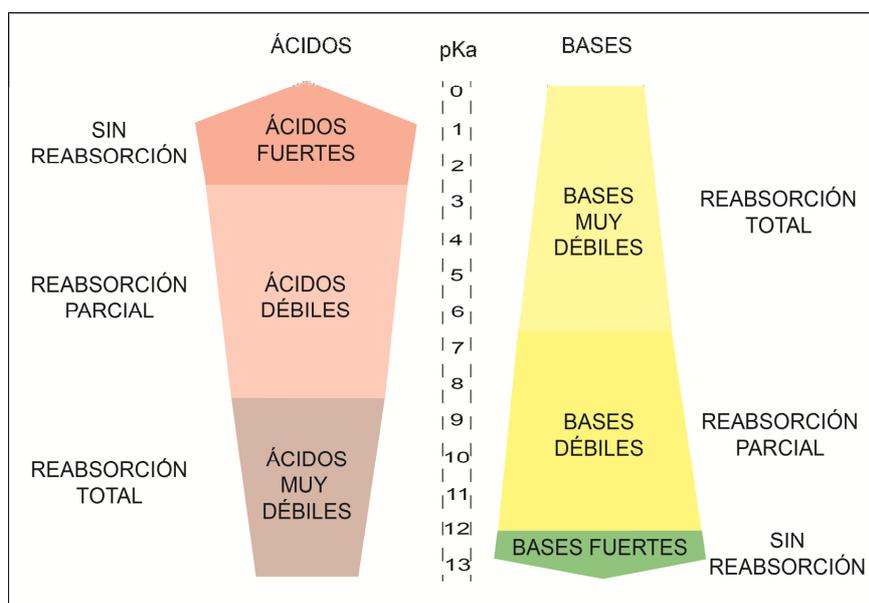


Figura 8: Influencia del pKa de los fármacos en su capacidad de reabsorción tubular, según el pH de la orina.

Por otra parte, en los túbulos proximales, existen transportadores para la **secreción activa** (contragradiante) de aniones y cationes. El transportador aniónico es importante para la excreción de ácidos como penicilina G y otros antibióticos, metabolitos glucurónidos de fármacos, la bilirrubina y el ácido úrico; mientras que el transportador catiónico es importante para la secreción de bases protonadas como tetrametilamonio, colina e histamina. En este sistema no influye la unión a proteínas plasmáticas ya que la afinidad por el transportador es muy alta, pasando rápidamente desde la unión a albúmina al transportador.

La **secreción biliar** hacia el tracto gastrointestinal es importante para los glucurónidos y otros metabolitos conjugados a través de los transportadores aniónicos en forma activa. Generalmente se continúa con cierto grado de hidrólisis del conjugado en el tracto intestinal y la **reabsorción pasiva** de una fracción del fármaco no ionizado, en repetidos ciclos, constituyendo el **ciclo entero-hepático**. Este efecto prolonga el efecto farmacológico del fármaco, y es típico de los estrógenos, y muchas drogas de acción central principalmente las benzodiazepinas (Figura 9).

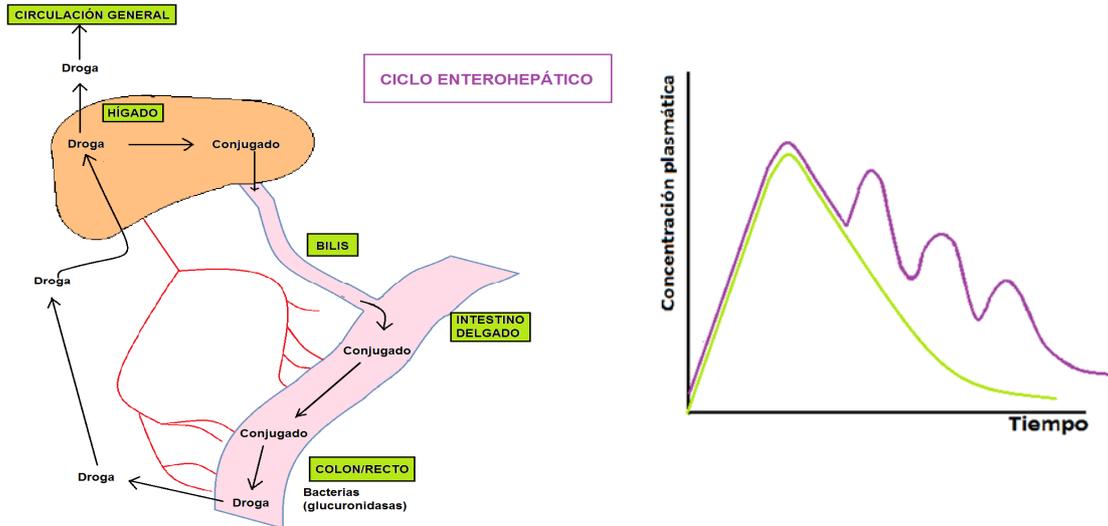


Figura 9: Esquema de circulación enterohepática de un fármaco (izquierda) y cinética plasmática de un fármaco con (línea violeta) y sin (línea verde) recirculación enterohepática (derecha)

## Interacciones por alteración de la excreción renal

### a- En filtración glomerular

Se han informado pocas interacciones a este nivel. Son las siguientes:

- La velocidad de excreción del **fluconazol** está disminuida por el uso con diuréticos, especialmente **tiazidas (hidroclorotiazida, clortalidona y otras)**, ya que el primero se excreta inalterado en más de un 90% por filtración glomerular, y la velocidad de esta está reducida durante el tratamiento crónico con diuréticos, que disminuyen el volumen extracelular y el flujo sanguíneo renal y en la arteriola aferente.

- Los **vasodilatadores** que aumentan la fracción de filtración como los arteriolares (**hidralazina, minoxidil, diazóxido**), los bloqueantes de calcio (**nifedipina, amlodipina, nitrendipina, verapamil, diltiazem**) y los inhibidores de la ECA (**enalapril, lisinopril, ramipril**) aumentan la excreción de otros fármacos que se filtran, por ej. **fenobarbital**.

- La acción vasodilatadora de **teofilina** aumenta la excreción de las **sales de litio** por aumento del flujo renal, lo cual requiere ajuste de dosis de las sales de litio, que tienen estrecho rango de seguridad y de efectividad.

### b- En secreción tubular

- El **probenecid** es un fármaco que antiguamente se utilizó porque al competir por el transportador activo de **penicilina y otros antibióticos**, se aprovechaba para potenciar y prolongar la actividad antimicrobiana. Posteriormente tuvo un uso por su competencia con el ácido úrico en otro transportador de reabsorción del mismo, actuando como uricosúrico.

- Los **salicilatos y el ketoprofeno** compiten por el transportador activo aniónico con **metotrexato**, con lo que éste puede alcanzar niveles tóxicos. Es importante advertir y evitar esta interacción.

- Los **salicilatos y aspirina** compiten con el transportador aniónico para la secreción tubular de **furosemida**, potenciándose los efectos de ambos.

#### **c- En reabsorción tubular**

- Los **salicilatos** en alta dosis (artritis) incrementan su concentración plasmática cuando se acidifica la orina, por ejemplo con **vitamina C (ácido ascórbico) o con fosfatos de potasio o sodio (urolítico o laxante)** ya que se reabsorbe mayor proporción como ácido débil, con riesgo de toxicidad.

- Los **salicilatos** en alta dosis (artritis) disminuyen su concentración plasmática cuando se alcaliniza la orina con antiácidos sistémicos como **bicarbonato de sodio**, por reducir la fracción no ionizada AH, lo cual lleva a pérdida de efecto analgésico-antitérmico, pero puede aprovecharse para tratar la intoxicación de salicilatos.

- Las aminas como **anfetaminas, pseudoefedrina, atropina, escopolamina, etc.** aumentan su reabsorción tubular por administración de **bicarbonato de sodio**, por aumentar la fracción de base libre B, lo cual puede acentuar los efectos tóxicos; y disminuyen su reabsorción en orina ácida, por favorecer la forma BH<sup>+</sup> lo cual se aprovecha para tratar la intoxicación con la administración de **cloruro de amonio**.

- La administración de **antiácidos orales sistémicos (bicarbonato, hidróxido de aluminio y magnesio)** aumenta la reabsorción tubular del fármaco básico **quinidina**, con riesgo de toxicidad.

- Las **sales de litio** (antimaníaco) se reabsorben en un 80% a nivel del túbulo proximal por el mismo transportador de reabsorción del ion sodio, por lo que la administración de **diuréticos**, especialmente **tiazidas**, por disminuir el nivel de sodio del organismo, aumentan la reabsorción de litio a niveles que pueden alcanzar toxicidad (náuseas, diarrea, temblor, ataxia, convulsiones, coma y muerte).

- Los **AINES** como **ibuprofeno, indometacina, naproxeno, meloxicam y piroxicam** entre otros, reducen la depuración renal de las **sales de litio** por aumentar su reabsorción tubular, incrementando la incidencia de efectos adversos de éste.

#### **d- Disminución de la solubilidad urinaria**

- **Norfloxacina** alcanza cristaluria, con el consiguiente dolor y daño renal cuando se administra con alcalinizadores urinarios (**inhibidores de la anhidrasa carbónica, bicarbonato, citrato**) ya que disminuyen su solubilidad urinaria.

#### **e- Alteración de la excreción biliar-intestinal**

- Los **antibióticos que afectan la flora microbiana intestinal** (ampicilina, tetraciclinas, macrólidos, rifampicina, etc.) impiden la reabsorción intestinal en el ciclo entero-hepático de los **anticonceptivos orales estrogénicos**, por impedir la hidrólisis bacteriana del conjugado, necesaria para la

reabsorción del estrógeno libre y mantenimiento del ciclo entero-hepático. La consecuencia es que disminuyen la concentración plasmática del estrógeno, y la eficacia anticonceptiva.

#### f- Excreción de fármacos mediante la glicoproteína P (P-gp)

La glicoproteína P (P-gp o MDR1, *multidrug resistance protein 1*) es una proteína localizada en las membranas celulares, que actúa como transportador de drogas expulsándolas hacia el exterior en una forma ATP dependiente y con especificidad de sustrato. Se encuentra en muchos órganos, especialmente en riñón e intestino, y puede tener efectos importantes en la farmacocinética de diferentes fármacos dado que puede afectar los procesos de absorción, distribución y eliminación de los mismos.

La P-gp tiene un rol fundamental en las interacciones fármaco-fármaco, dado que la administración conjunta con sustancias que induzcan o inhiban a la P-gp puede alterar la concentración en plasma y en tejidos de un fármaco sustrato de esta glicoproteína, y por ende modificar su efecto farmacológico final (Tabla 5).

A continuación se citan algunos ejemplos de interacciones que tienen como blanco la P-gp:

- El uso concomitante de loperamida con verapamil aumenta el riesgo de producir depresión respiratoria. El origen de este efecto es debido posiblemente a que la inhibición de la P-gp producida por el bloqueante de calcio aumenta el pasaje de loperamida a través de la barrera hematoencefálica.
- Fármacos inductores de la P-gp como la rifampicina o la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) disminuyen las concentraciones plasmáticas de digoxina, mientras que fármacos que inhiben a la P-gp como la eritromicina, verapamil, espironolactona y paracetamol dan el efecto opuesto, con el consiguiente riesgo de toxicidad digitalica.
- Similares interacciones por P-gp se han informado para los inmunosupresores ciclosporina y tacrolimus, cuyas toxicidades son principalmente de origen renal.

**Tabla 5: Ejemplos de fármacos que interactúan con la P-gp**

Fármacos que interactúan con la P-gp		
Sustratos	Inhibidores	Inductores
Antiácidos (ranitidina) Antibióticos (eritromicina, rifampicina, tetraciclina, levofloxacina) Antiemético (ondasetrón) Antineoplásicos (daunorrubicina, vincristina, vinblastina, etopósido, paclitaxel) Antagonistas $\beta$ adrenérgicos (carvedilol, celiprolol) Inhibidores de proteasa (ritonavir, saquinavir, indinavir) Bloqueantes de $Ca^{2+}$ (verapamil) Cardiotónicos (digoxina) Inmunosupresores (ciclosporina A, tacrolimus) Opioides (morfina, loperamida) Otros: colchicina, itraconazol, ivermectina	Macrólidos (eritromicina, claritromicina) Inhibidor de proteasas (ritonavir) Bloqueantes de canales de $Ca^{2+}$ (verapamil) Otros (espironolactona y paracetamol)	Rifampicina Hierba de San Juan

## Interacciones de origen farmacodinámico

La Farmacodinamia es el estudio de los mecanismos de acción de un fármaco y de sus efectos fisiológicos o bioquímicos, es decir **qué le hace un fármaco al organismo** (ver Figura 1).

Las interacciones farmacodinámicas, es decir, que tienen su origen en los mecanismos de acción de un fármaco son las más frecuentes y no siempre fáciles de detectar. Algunas de los tipos de interacción posibles son:

**Efectos aditivos:** cuando dos fármacos suman sus efectos. Esto se da si ambos fármacos actúan sobre el mismo sistema efector, generalmente teniendo parte del mecanismo común (fármacos homérgicos). Por ejemplo, dos fármacos que aumentan la presión arterial, aun cuando uno sea vasoconstrictor y el otro aumente la volemia por retención de sodio y agua. Sin embargo, puede haber **supraaditividad** (efecto combinado mayor a la suma de los individuales) o **infraaditividad** (efecto combinado menor a la suma de ambos) cuando se agregan otras variables como cambios farmacocinéticos además de un efecto farmacodinámico común. Esto se aprovecha para reducir la toxicidad, por ejemplo en las combinaciones de sulfas a dosis subclínicas individualmente.

**Sinergismo:** cuando la respuesta de una droga es aumentada por otro fármaco que actúa produciendo un efecto farmacológico diferente (fármacos heterérgicos). Por ejemplo, la teofilina aumenta la hiperglucemia producida por adrenalina debido a que aumenta el nivel de AMPc por un mecanismo diferente; otro caso sería la asociación de L-dopa + carbidopa utilizada en Parkinson. Un sinónimo común de sinergismo es **potenciación**. La mayoría de las combinaciones utilizadas en clínica emplean fármacos heterérgicos para aumentar efectos.

**Antagonismo:** cuando el efecto combinado de un fármaco es evitado o disminuido por otro fármaco. Esto se aprovecha clínicamente para evitar efectos colaterales adversos. Pueden competir en el mismo receptor (**antagonismo competitivo**) o afectar otra etapa del mecanismo efector (**antagonismo no-competitivo**) o tener un efecto en otro sistema opositor (**antagonismo funcional o fisiológico**) o en diversos órganos o sistemas (**antagonismo físico**). Se puede ver el análisis de estos mecanismos en el capítulo previo. Ejemplos de cada clase serían: atropina para evitar los efectos muscarínicos del uso de neostigmina (competitivo); un bloqueante de calcio para corregir un espasmo intestinal (excesiva contractura de músculo liso por estimulación muscarínica) (no-competitivo); una anfetamina para corregir la excesiva sedación producida por anticonvulsivantes como fenobarbital (antagonismo funcional), o pseudoefedrina para corregir la excesiva hipotensión debida a anestesia raquídea (antagonismos físicos, actuando en distintos sistemas del organismo).

Se tratarán a continuación los orígenes farmacodinámicos de interacciones medicamentosas frecuentes:

## Interacciones de fármacos que afectan la presión arterial

### a- Potenciación de la hipertensión

- La administración de un antidepresivo inhibidor de la monoaminoxidasa (**IMAO**) como **moclobemida y tranilcipromina** en forma crónica aumentan el nivel del neurotransmisor noradrenalina (NA) en las neuronas del sistema simpático, tal que la posterior administración de aminas de acción indirecta como **pseudoefedrina** (descongestivos, broncodilatadores), de agonistas alfa-1 como **fenilefrina** (descongestivo), o del precursor de dopamina **levodopa** (antiparkinsoniano) pueden desencadenar una crisis hipertensiva, por lo que debe evitarse el uso simultáneo con un **IMAO**. En la actualidad, los IMAO han sido reemplazados por otros antidepresivos tales como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) debido a su potencial riesgo de interacciones.

- Los **bloqueantes-beta (propranolol, nadolol, timolol)** pueden aumentar la respuesta presora a **fenilefrina** por un mecanismo aún no claro. Se aconseja precaución en la asociación.

- La administración de **propranolol, timolol o nadolol** (bloqueantes  $\beta_1$  y  $\beta_2$ ) a pacientes tratados con **metildopa** (agonista alfa-2) puede originar aumento de la presión arterial por suma de la acción vasoconstrictora  $\alpha_2$ -adrenérgica no contrarrestada por la acción  $\beta_2$  vasodilatadora. Por ello, se aconseja que si un paciente debiera adicionar un bloqueante  $\beta$  a metildopa o clonidina, lo haga reduciendo las dosis de ambos fármacos durante un período de adaptación.

- La suspensión brusca de **clonidina** en un hipertenso tratado con **propranolol u otro bloqueante beta** puede originar una hipertensión rebote muy marcada por una respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica exagerada al no compensarse con la acción vasodilatadora  $\beta_2$ . Debe suspenderse antes el propranolol que la clonidina, o mejor reemplazarlo por **carvedilol** (bloqueante alfa/beta).

- Las aminas indirectas **anfetaminas, y pseudoefedrina** potencian sus efectos hipertensivos en forma riesgosa, entre sí o con antidepresivos tricíclicos y con IMAOs. Asimismo, pueden potenciar la vasoconstricción periférica con la consecuente isquemia por el uso con el antimigrñoso **ergotamina**.

### b- Potenciación de la hipotensión

- Los **diuréticos** como furosemida, hidroclorotiazida o clortalidona potencian la acción hipotensora de los antihipertensivos de cualquier mecanismo (**inhibidores de la ECA, ARAI, agonistas  $\alpha_2$ , beta-bloqueantes y antagonistas cálcicos** independientemente de sus mecanismos, porque son muy natriuréticos, con lo que causan reducción de la volemia a corto plazo y vasodilatación leve en modo crónico.

- Las **fenotiazinas y otros antipsicóticos (clorpromazina, tioriazina, haloperidol)** y los antidepresivos tricíclicos (**imipramina, amitriptilina, etc.**) o el nuevo antidepresivo bloqueante alfa-2 y alfa-1 **mirtazapina**, potencian la acción de los diversos grupos de **antihipertensivos**, debido a sus respectivos efectos colaterales alfa-bloqueantes.

- Las **benzodiazepinas**, los **barbitúricos** y los **anestésicos locales (vías raquídea y peridural) y generales** potencian la acción de fármacos hipotensores (**prazosin, vasodila-**

**tadores, bloqueantes de calcio)** porque bloquean la conducción axónica en fibras simpáticas preganglionares.

### c- Antagonismo de la hipotensión

- Todos los **AINES** y especialmente los más potentes, siguiendo el orden creciente de potencias como: ibuprofeno, **meloxicam, diclofenac, salicilatos, indometacina, piroxicam, y otros** se oponen a la respuesta antihipertensiva de **diuréticos, IECA como enalapril, ARAII como losartán, beta-bloqueantes como carvedilol, nebivolol, atenolol, metoprolol, propranolol u otros antihipertensivos**, por inhibir la síntesis de prostaglandinas en los túbulos renales, las cuales regulan el transporte de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y el flujo renal y consecuentemente la volemia.

- Los **estrógenos y progestágenos (típicos de los anticonceptivos orales)** elevan la renina plasmática y promueven la retención de sodio y agua, por lo que se oponen a los efectos de los fármacos **antihipertensivos**.

- Los **glucocorticoides** suelen tener asociada una actividad mineralocorticoide, por la cual retienen  $\text{Na}^+$  y agua, disminuyendo la acción natriurética de los **diuréticos**, y los efectos **antihipertensivos** de cualquiera de los fármacos tratantes.

- Los **antidepresivos tricíclicos (desipramina, imipramina, amitriptilina)** pueden oponerse al efecto antihipertensivo de la **clonidina**, posiblemente debido a que al inhibir la recaptación de NA, la potencian en las sinapsis centrales o periféricas. Debe evitarse asociarlos.

## Interacciones que afectan al funcionamiento cardiaco

### a- Potenciación de arritmias

- El diurético **furosemida** puede favorecer la aparición de arritmias por **digoxina**, ya que ésta tiene bajo margen terapéutico y la hipopotasemia producida por el diurético favorece la generación de arritmias por sobrecarga de calcio y postdespolarizaciones.

- La estimulación leve producida por las metilxantinas (teofilina, cafeína) que antagonizan al receptor inhibitorio de adenosina, o la amina indirecta **pseudoefedrina** pueden potenciar una arritmia promovida por uso crónico o sobredosis de **digoxina**.

- Los fármacos con actividad **antimuscarínica (atropina, escopolamina, homatropina, ciclopiptolato, fenotiazinas y antipsicóticos, quinidina, antidepresivos tricíclicos)** pueden potenciar una arritmia promovida por uso crónico o sobredosis de **digoxina**, y atenuar la bradicardia inducida por **beta-bloqueantes y antagonistas cálcicos**.

- Los **antiarrítmicos de clase Ia (quinidina, procainamida, disopiramida) y en menor medida los de clases III (amiodarona y sotalol)** prolongan el intervalo QT del ECG con riesgo arritmogénico (de "*torsade de points*") especialmente si se asocian a otros fármacos que también lo prolongan (fenotiazinas como **tioridazina, clorpromazina, haloperidol y droperidol**, antipsicóticos atípicos como **clozapina, pimozida y olanzapina**, antidepresivos como **los tricíclicos y citalopram, cisaprida, litio, eritromicina y otros macrólidos**, entre otros.

- Los anticolinesterásicos **edrofonio** o **neostigmina** pueden potenciar los efectos muscarínicos de **digital** produciendo excesiva bradicardia.
- El relajante muscular **succinilcolina** potencia los efectos arritmogénicos de la **digoxina**.

#### **b- Potenciación de depresión miocárdica**

- Los **antagonistas beta-adrenérgicos (propranolol)**, los **bloqueantes de Ca<sup>2+</sup> (verapamil, diltiazem)** y los **antiarrítmicos flecainida, lidocaína, fenitoína, amiodarona y disopirramida** potencian la bradicardia producida por los efectos parasimpaticomiméticos indirectos de **digoxina**, produciendo riesgo de bloqueo cardíaco.
- La combinación de dos o más diversos **antiarrítmicos (amiodarona, propafenona, flecainida, sotalol, propranolol, diltiazem, verapamil)** entre sí pueden promover la aparición de paro sinusal o arritmias, por lo que se aconseja especial y continua supervisión médica.
- Los **beta-bloqueantes (propranolol, atenolol, esmolol)**, los **bloqueantes cálcicos (verapamil, diltiazem)** y los **antiarrítmicos de clases I (lidocaína, fenitoína, quinidina, propafenona, flecainida) y III (amiodarona, sotalol)** pueden potenciar entre sí sus efectos depresores del ritmo y de la contractilidad miocárdica.

### **Interacciones de fármacos con actividad anticolinérgica**

- Los **anticolinérgicos (homatropina, oxibutinina, tolterodina, hioscina u otros)** potencian sus efectos periféricos (constipación, xerostomía, taquicardia, cicloplejia) y centrales (sedación) por acción de los **antihistamínicos de primera generación (difenhidramina, clorfeniramina, dimenhidrato, prometazina)** dado que este grupo de fármacos también posee actividad antimuscarínica.
- El uso de **anticolinérgicos sistémicos (por ej. orfenadrina, trihexifenidilo, homatropina, hioscina, propinoxato)** debe evitarse en pacientes tratados con **fenotiazinas o con antidepresivos tricíclicos**, porque éstos fármacos también tienen efecto antimuscarínico, y se desencadenan efectos aditivos como estreñimiento, dolor y distensión abdominal o íleon paralítico. Posiblemente se desencadena rubor y golpe de calor y disminución de los efectos extrapiramidales.
- La administración de **amantadina** en pacientes parkinsonianos tratados con **trihexifenidilo** potencia los efectos anticolinérgicos como confusión y alucinaciones.
- Los fármacos con acción anticolinérgica como los **antihistamínicos de primera generación (difenhidramina, dimenhidrato)** deben utilizarse con precaución en pacientes tratados con el antipsicótico **levomepromazina** porque se producen efectos extrapiramidales.
- Los bloqueantes colinérgicos nicotínicos **relajantes del músculo esquelético (rocuroonio, mivacuronio)** potencian el bloqueo al tratarlo con los antibióticos aminoglucósidos vía IM (**kanamicina, gentamicina, etc.**) por lo que deben administrarse con suma precaución en el post-operatorio.

## Interacciones entre fármacos depresores centrales

### a- Potenciación de efectos depresores

- Los diversos fármacos sedantes como **fenobarbital, benzodiazepinas, fenotiazinas, fenitoína, clonidina, antidepresivos tricíclicos, IMAO's, antihistamínicos de primera generación, antimuscarínicos y alcohol**, potencian los efectos depresores centrales entre sí ya que todos disminuyen el alerta y la coordinación motora.

- Los **anticolinérgicos (ciclopentolato, homatropina, trihexifenidilo)** potencian los efectos de hiperpirexia, confusión, alucinaciones, y efectos extrapiramidales en pacientes premedicados con el antipsicótico **levomepromazina**.

- Dosis tóxicas de **antidepresivos tricíclicos** pueden potenciar el efecto de depresión central y respiratoria de los **barbitúricos**.

- El **alcohol** potencia la depresión central producida por **barbitúricos, sedante-hipnóticos o antiepilépticos**, o por **benzodiazepinas**.

- El **alcohol** aumenta sus efectos nocivos sobre la función motora (temblor, incoordinación) cuando el paciente está medicado con los antidepresivos más sedantes **amitriptilina y doxepina**.

- La **amantadina** y la **levodopa** sinergizan sus efectos antiparkinsonianos, ya que la primera libera DA y la segunda es precursor de su síntesis.

- Los **anestésicos generales** sinergizan sus efectos depresores centrales con otros sedantes como **fenotiazinas, benzodiazepinas y barbitúricos** (por lo que esto se aprovecha empleándolos como auxiliar o inductor de la anestesia para reducir la dosis anestésico además de sus efectos diversos).

- Los **relajantes neuromusculares (succinilcolina)** tienen sinergismo con los **anestésicos generales (sevoflurano, enflurano y halotano)** en el bloqueo neuromuscular.

- Los **anestésicos generales halogenados (halotano, enflurano, etc.)** sensibilizan al corazón a los efectos de **adrenalina** o de **beta-bloqueantes**.

- El uso de **anticolinérgicos (por ej. orfenadrina, trihexifenidilo)** debe evitarse en pacientes tratados con **fenotiazinas (tioridazina, clorpromazina, etc.)** con **haloperidol** o con nuevos antipsicóticos como **olanzapina**, porque se desencadenan efectos aditivos como estreñimiento, dolor y distensión abdominal o íleon parálítico, y posiblemente golpe de calor y disminución del efecto antipsicótico y de los efectos extrapiramidales.

### b- Antagonismo de efectos centrales

- Los antipsicóticos tipo **fenotiazinas (clorpromacina, tioridazina, trifluorperazina, etc.)** o el **haloperidol** antagonizan los efectos antiparkinsonianos de **levodopa** ya que los primeros inhiben al receptor dopaminérgico.

- Las **anfetaminas, pseudoefedrina y otros estimulantes menores (cafeína, teofilina)** se oponen al efecto de sedantes y ansiolíticos, y particularmente del **haloperidol (an-**

**tipsicótico**), No asociar en pacientes psicóticos. El haloperidol es útil para contrarrestar la toxicidad de anfetaminas.

- La administración del sedante **diazepam o el anticonvulsivante fenitoína** disminuye la acción de **levodopa**, con empeoramiento del Parkinson y contribuye a signos de amnesia (no se conoce el mecanismo).

## **Interacciones asociadas a estimulación central**

### **a- Potenciación de la estimulación central**

- Ante el uso de **antidepresivos tricíclicos o ISRS** en pacientes epilépticos se requiere aumentar la dosis de **fenitoína u otro anticonvulsivante** ya que los antidepresivos reducen el umbral convulsivo.

- Los **IMAO's** pueden aumentar la acción antiparkinsoniana de **levodopa** ya que potencian el nivel central de dopamina, pero también potencian las acciones periféricas de hipertensión, taquicardia y palpitaciones.

- Los **antidepresivos tricíclicos, los ISRS** y los **IMAO's** potencian sus acciones centrales y periféricas dando lugar al "síndrome de serotonina" que se manifiesta con hiperpirexia, temblor, excitación, convulsiones y coma, especialmente a dosis altas y/o por vía parenteral. Se agrava si se administran **anfetaminas o pseudoefedrina**, produciendo cefaleas, vómitos, excitación o irritabilidad e hipertensión.

- El uso de **pseudoefedrina** como anticongestivo durante el tratamiento antiasmático con **teofilina** potencia la excitación central o psíquica y el insomnio.

### **b- Antagonismo de la estimulación central**

- Las **fenotiazinas (clorpromazina, tioridazina, trifluorperazina)** y el **haloperidol** antagonizan las acciones estimulantes (conducta y emesis) de **levodopa** y de agonistas dopaminérgicos como **bromocriptina, cabergolina y pergolida**, por actuar ambos en forma opuesta sobre los receptores dopaminérgicos en las vías dopaminérgicas de conducta y en la zona quimiorreceptora gatillo. Esto se aprovecha terapéuticamente para reducir efectos adversos

## **Interacciones de los anticoagulantes orales y antiagregantes**

Es necesario advertir a los pacientes anticoagulados que deben comunicar el agregado o suspensión de cualquier otro medicamento, incluso los de venta libre o alimentos, ya que pueden potencialmente ocurrir interacciones. Muchas de ellas son de tipo farmacocinético y se han visto anteriormente (con salicilatos, sulfamidas, rifampicina, entre otras). Aquí repasaremos las de origen farmacodinámico.

### **a- Potenciación de la anticoagulación**

- Las **cefalosporinas** potencian las acciones anticoagulantes de **warfarina y acenocumarol**, ya que las cefalosporinas suman acciones inhibitorias de la epoxidación de la vitamina K y carboxilación simultánea de los factores de coagulación, a los efectos anti-vitamina K de los anticoagulantes orales (ACO), con el consecuente riesgo de hemorragia.

- Los fármacos antiagregantes plaquetarios (**aspirina, ticlopidina, clopidogrel, abciximab**) pueden potenciar el riesgo de hemorragia de un **ACO**.

- El antihiperlipidémico **clofibrato** potencia el efecto anticoagulante de **warfarina y dicumarol** ya que acelera la renovación de factores de la coagulación e inhibe la función plaquetaria. Debe evitarse el tratamiento simultáneo, o ajustar la dosis de clofibrato.

- Los antibióticos **aminoglucósidos (gentamicina, estreptomina) y el cloranfenicol** pueden potenciar los efectos de los **anticoagulantes orales** especialmente si hay **deficiencia de vitamina K en la dieta**, ya que inhiben la producción de vitamina K por las bacterias intestinales dando hipoprotrombinemia.

- Los **glucocorticoides** promueven la aparición de hemorragias en pacientes tratados con **anticoagulantes orales**, ya que disminuyen la formación de factores de la coagulación por aumentar su catabolismo y tienen actividad fibrinolítica. Si inducen ulceración gastrointestinal, pueden aumentar el potencial hemorrágico de los **anticoagulantes orales** a nivel gastrointestinal. Puede requerirse ajuste de la dosis del anticoagulante.

- Los **estrógenos** de los **anticonceptivos orales** pueden alterar la respuesta anticoagulante, requiriéndose ajuste de dosis, ya que los estrógenos son procoagulantes por aumentar la síntesis de factores de la coagulación y disminuir a la antitrombina III.

- Las **hormonas tiroideas** aumentan el catabolismo de los factores de la coagulación dependientes de vitamina K, por lo que se potencia la anticoagulación y se requiere reducir la dosis anticoagulante en pacientes que requieren reposición tiroidea.

- La **heparina IV o la reviparina** pueden prolongar aún más el tiempo de protrombina dando valores erróneos para la selección de la dosis de **anticoagulante oral**.

- Los **AINES** como **indometacina y aspirina** (no selectivos para COX-1 y COX-2) son ulcerógenos y pueden inhibir la función plaquetaria (antiagregantes), por lo que potencian la acción de los **anticoagulantes orales**, especialmente la hemorragia gastrointestinal.

- El **metotrexato** inhibe la síntesis de factores de la coagulación e interfiere en la función plaquetaria, por lo que potencia la acción de los **anticoagulantes orales y de antiagregantes**.

- La **vitamina E (alfa-tocoferol, antioxidante)** potencia la hipoprotrombinemia producida por **anticoagulantes orales** por interferir con el efecto de la vitamina K en la producción de factores de coagulación. Debe evitarse el tratamiento con vitamina E en pacientes anticoagulados.

### **b- Inhibición de la anticoagulación**

- El exceso de ingesta de **vitamina K en alimentos** (espárragos, col, lechuga, nabo, té verde, espinacas, berros, tomate, café) puede inhibir la respuesta hipoprotrombinémica a los **anticoagulantes orales (warfarina)**.

- El retiro de **barbitúricos** puede originar hemorragia en un paciente tratado con **anticoagulantes orales** ya que se deja de activar el metabolismo de éstos. Evitar el uso de barbitúricos en pacientes anticoagulados (Interacción farmacocinética).

- La **griseofulvina** estimula el metabolismo hepático de los **anticoagulantes orales** (interacción farmacocinética).

## Interacciones que afectan la glucemia

### a- Potenciación de la hipoglucemia

- La **ingesta aguda de alcohol** puede producir una reacción de hipoglucemia grave en pacientes tratados con un **antidiabético** especialmente si está en ayunas, debido a la actividad hipoglucemiante intrínseca del etanol (inhibe la gluconeogénesis) sumado a la interacción farmacocinética de que puede inhibir el metabolismo de los hipoglucemiantes orales.

- Los **beta-bloqueantes (propranolol, esmolol, atenolol, etc.)** retrasan la recuperación de la hipoglucemia inducida por **insulina o por un hipoglucemiante oral** (si el paciente permanece largos períodos sin ingesta de alimento). Esto es debido a que los beta-bloqueantes impiden el efecto hiperglucémico de la adrenalina liberada (que se ejerce en el receptor beta-adrenérgico hepático y se traduce en glucogenolisis). Además, inhiben la respuesta de taquicardia (por bloqueo del beta-1 cardíaco) que alerta al paciente de la hipoglucemia. Más crónicamente y en los no-selectivos, los beta-bloqueantes inhiben la liberación de insulina (bloqueo beta-2 en islotes pancreáticos), pueden producir un pico hipertensivo debido al bloqueo beta-2 de vasos estimulados por la adrenalina liberada, y pueden deteriorar la circulación periférica en extremidades. Se recomienda reemplazarlos por otro bloqueante beta-1 selectivo (atenolol, metoprolol) y advertir de la falta de la señal de taquicardia, aunque sí persistirá la sudoración aumentada típica de la hipoglucemia para alertarlo.

- Los **salicilatos** potencian la hipoglucemia porque sensibilizan a las células beta del páncreas a la **insulina** y potencian su secreción.

- Los **inhibidores de la ECA** potencian la hipoglucemia producida por las sulfonilureas, por un mecanismo desconocido.

Consultar las interacciones farmacocinéticas de los hipoglucemiantes orales en el inicio de este capítulo

### b- Inhibición de la hipoglucemia

- Los diuréticos **tiazidas** ejercen un efecto diabético debido en parte a la depleción de potasio y la hiponatremia que causan una reducción de la secreción de insulina. Debe controlarse la glucemia en pacientes diabéticos tratados que reciben tiazidas crónicamente.

- Los **glucocorticoides** y los **anticonceptivos orales con alta dosis de estrógeno** provocan hiperglucemia y resistencia a la insulina, por ser catabólicos, lo cual podría requerir ajuste de la dosis del **hipoglucemiante**.

- Fármacos como **fenitoína, clonidina, bloqueantes de calcio** producen hiperglucemia al inhibir directamente la liberación de insulina por sus mecanismos respectivos (estabilizante de membranas por bloqueo de canales de sodio, agonista alfa-2 adrenérgico hiperpolarizante y bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula pancreática, todos reductores de la exocitosis).

## Bibliografía

AHFS. (2005). *Drug Information*. ASHP.

Goodman & Gilman (2014). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. XII Edición. Mexico, Bogotá, Buenos Aires: Interamericana.

Finch, A., Pillans, P. (2014). P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. *Australian Prescription* 37, 137-194.

Hansten, P. D. (1988). *Interacciones farmacológicas*. V Edición. Barcelona: Ediciones Doyma.

Katzung, B. G. (2013). *Farmacología básica y clínica*. 11ª edición. Editorial McGraw-Hill.

Landrum Michalets, E. (1998). Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy* 18 (1), 84-112.

San Miguel Samano, M. T., Sánchez Méndez, J. L. (2011). *Interacciones alimento/medicamento*. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 35 (1), 3-12. Madrid.

— (2014) USP DI. Drug Information for the Health Care Professional.

Velázquez. (2005). *Farmacología Básica y Clínica*. 17ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana.

— (1999). Reacciones adversas relacionadas con la metabolización de los fármacos. *Butlletí groc*. 12(3), 9-12.

Remington (2003). *Farmacología*. 20 edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

## Los autores

### **Colareda, Germán A.**

Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas-Área Ciencias Biológicas, Fac. de Cs. Exactas de la UNLP. Farmacéutico y Licenciado en Ciencias Farmacéuticas, UNLP. Becario de UNLP. Ayudante diplomado dedicación exclusiva, cátedra Farmacología-Farmacía, FCE, UNLP. Últimas Publicaciones: *Exp Physiol* (2015: 100, 680-97); *Clin Exp Pharm Physiol* (2016: 42, 102-115). Capítulos de libros: *Mitochondrial Dysfunction: Risk Factors, Symptoms and Treatment Options* (2014). Integrante del proyecto “Farmacología experimental y energética cardíaca en diversos modelos animales y efectos de plantas medicinales”.

### **Díaz, Romina Gisel**

Doctora en Ciencias de la Salud de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. Farmacéutico y Licenciada en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Investigador Asistente, Área Medicina, Ciencias Básicas, CONICET. Jefe de Trabajos Prácticos, cátedra Farmacología I y II, Área Farmacia, UNLP. Publicaciones: *Epidermal Growth Factor Receptor Silencing Blunts the Slow Force Response to Myocardial Stretch.*, Journal of the American Heart Association, septiembre 2016; *Myocardial mineralocorticoid receptor activation by stretching and its' functional consequences*, Hypertension, 2014; *Inhibition of carbonic anhydrase prevents the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1-dependent slow force response to rat myocardial stretch*, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. Distinciones: Premio Dra. María Cristina Camilión de Hurtado al mejor trabajo de investigación cardiovascular, SAFIS, 2015. Premio Prof. Dr. Carlos Taquini al Mejor Trabajo de Investigación Básica, SAHA, 2015, Reconocimiento a Egresada Distinguida de Posgrado, UNLP, 2014, Premio Simposio Jóvenes Investigadores, SAFE, 2014.

### **Pedro, Martín**

Farmacéutico por la Fac. de Cs. Exactas de la UNLP. Doctor en Ciencias Exactas, Área Ciencias Biológicas, UNLP. Especialista en electrofisiología, farmacología de canales iónicos con especial aplicación al músculo liso vascular. Profesor Adjunto Ordinario dedicación simple a cargo de Elementos de Farmacología (Lic. en Bioquímica) y Farmacología (Lic. en Óptica Ocular y Optometría), FCE-UNLP. Investigador Asistente del CONICET (2016) del Instituto de estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP) CONICET - UNLP, tema: Hipertensión arterial y su control por diuréticos de tipo tiazida: rol del canal de K<sup>+</sup> de tipo BK en su efecto hipotensor cró-

nico. Director responsable del proyecto de extensión universitaria (2014) “Magistrales, laboratorio social”. Premio SAFE 2015 (Sociedad Argentina de Farmacología Experimental).

### **Quiroga, Pablo**

Farmacéutico y Licenciado en Cs. Farmacéuticas de la Fac. de Cs. Exactas de la UNLP. Experto Universitario en Toxicología y Máster Universitario en Toxicología, Universidad de Sevilla España. Profesor Titular de la Cátedra de Control de Calidad de Medicamentos y Profesor Titular a Cargo de la Cátedra Toxicología Farmacéutica, FCE-UNLP. Docente a cargo del Módulo Bioensayos - Magister de Plantas Medicinales (FCE-UNLP); Docente de la Carrera de Médico Especialista en Medicina de la Industria Farmacéutica (Facultad de Medicina, UBA). Jefe del Departamento de Investigaciones Farmacológicas de Laboratorios Bagó S.A. Miembro de la Comisión Permanente de Farmacopea Argentina, Especialista Externo para la evaluación de Proyectos de Investigación UBACYT 2014-2017 Grupos En Formación (UBA). Autor de cinco capítulos de libros, coautor de trabajos científicos publicados en revistas internacionales con referato, disertante en Congresos y Workshops Nacionales e Internacionales.

### **Wikinski, Silvia**

Médica especialista en Psiquiatría (Facultad de Medicina, UBA) y Doctora por la UBA, orientación Farmacología. Profesora Adjunta de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA. Autora y compiladora del libro *El Tratamiento Farmacológico en Psiquiatría* (2013), y más de 30 trabajos científicos en revistas indexadas. Directora del Nodo de Preclínicos de la Plataforma Tecnológica EBAL (CONICET-UNLP). Premios “Actualización en Psiquiatría” de la Fundación Florencio Fiorini (2007), “Lucio V. López” de la Academia Nacional de Medicina (2014), “Juan Madera” de la Facultad de Medicina de la UBA (2000) y Accesit Jornadas Científicas de la Academia de Farmacia y Bioquímica de la UBA (1998).

## **Coordinadores**

### **Consolini, Alicia E.**

Doctora en Ciencias Farmacéuticas y Licenciada en Cs. Farmacéuticas por la UNLP. Profesora Titular, cátedra Farmacología-Farmacia, Fac. Cs. Exactas, UNLP. Investigadora categoría II. Directora de la Maestría en Plantas Medicinales, UNLP. Exbecaria del CONICET, 3 estancias mensuales en el exterior. Coordinadora de la comisión de carrera de Farmacia. Autora de 31 publicaciones científicas, las 3 últimas: *Exp Physiol* (2015: 100, 680-97); *Clin Exp Pharm Physiol* (2016: 42, 102-115); *Pharmacology online* (2016: 2, 91-99). Autora de tres capítulos de libros en: *Handbook of Ethnopharmacology* (2008); *Cardiomyopathies causes, effects and treatment* (2009: 57-65); *Mitochondrial Dysfunction: Risk Factors, Symptoms and Treatment Options* (2014). Ha recibido dos premios. Directora de 3 tesis doctorales, 5 de Maestría y 2 de

especialización finalizadas, y 3 tesis de Maestría en desarrollo. Directora de proyectos de investigación de CONICET y UNLP.

### **Ragone, María Inés**

Doctora por la Facultad de Ciencias Exactas, Farmacéutico y Licenciada en Ciencias Farmacéuticas de la UNLP. Investigador Asistente, CONICET. Profesor Adjunto, cátedra Farmacología-Farmacía, Fac. Cs. Exactas, UNLP. Últimas publicaciones: *Exp Physiol* (2015: 100, 680-97); *Clin Exp Pharm Physiol* (2016: 42, 102-115); *Pharmacology online* (2016: 2, 91-99). Autora de capítulos de libros: *Handbook of Ethnopharmacology* (2008); *Cardiomyopathies causes, effects and treatment* (2009: 57-65); *Mitochondrial Dysfunction: Risk Factors, Symptoms and Treatment Options* (2014). Ha recibido el Premio Simposio Jóvenes Investigadores, SAFE, 2014. Integrante del proyecto "Farmacología experimental y energética cardíaca en diversos modelos animales y efectos de plantas medicinales".

Farmacodinamia general e interacciones medicamentosas : mecanismos de acción de fármacos y metodologías de estudio experimental / Alicia Elvira Consolini ... [et al.] ; coordinación general de Alicia Elvira Consolini ; María Inés Ragone. - 1a ed . - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2017.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online  
ISBN 978-950-34-1572-6

1. Medicamentos. I. Consolini, Alicia Elvira II. Consolini, Alicia Elvira, coord. III. Ragone, María Inés , coord.  
CDD 615

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata  
47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina  
+54 221 427 3992 / 427 4898  
edulp.editorial@gmail.com  
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2017  
ISBN 978-950-34-1572-6  
© 2017 - Edulp

**e**  
**exactas**