

Libro de resúmenes: Sesión de carteles Farmadrid XX

Comité Organizador: Emilio Ambrosio Flores, Alejandro Higuera Matas, Javier Ibias Martín, Nuria del Olmo Izquierdo, Miguel Miguéns Vázquez, Santiago Morales Coria, M^a Amparo Assis Duart, David Roura Martínez, Gonzalo López Montoya

Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología. UNED

Lugar
Facultad de Psicología
Salón de Actos
C/ Juan del Rosal, 10
Ciudad Universitaria
28040 - MADRID

P.1. Sistemas de liberación controlada (micropartículas) de moléculas proapoptóticas .

Martín Sabroso, C., Torres Suárez, A.I. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

Página web: <http://www.farmadrid.org.es>

La apoptosis es un conjunto de reacciones bioquímicas encaminadas a producir la muerte celular de manera controlada. En situaciones normales los mecanismos pro- o anti-apoptóticos actúan de forma equilibrada, y si se rompe este equilibrio se pueden desencadenar diferentes cuadros patológicos. Enfermedades asociadas a la inhibición de apoptosis son el cancer y las enfermedades autoinmunitarias. La inducción de los procesos de apoptosis en una célula supone la activación de las enzimas citosólicas denominadas caspasas (cisteinil-aspartato proteasas), y se puede producir por dos vías distintas: 1) Vía mitocondrial: estímulos internos o externos provocan cambios iónicos entre la matriz de la mitocondria y el citosol que aumentan la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial. produciéndose la liberación de proteínas como el citocromo C que activan las caspasas,. Los glucocorticoides, como la dexametasona, son algunas de las sustancias exógenas que actúan a este nivel promoviendo la apoptosis. 2) Vía extrínseca: debida a la unión de ligandos específicos a los "receptores de muerte celular", localizados en la membrana plasmática. A la proteína Fas (CD95) se une su ligando, FasL, y desencadenan la activación de las caspasas efectoras y la apoptosis. El objetivo del trabajo es elaborar micropartículas que contengan moléculas con capacidad proapoptótica (dexametasona y proteína Fas), que vehiculicen estas moléculas evitando su degradación y que liberen las moléculas activas de forma prolongada en el tiempo tras una única administración, prolongando así sus efectos. Se ha logrado poner a punto un método de elaboración de micropartículas de dexametasona y de ovoalbúmina (utilizada como proteína modelo) obteniéndose, en ambos casos, sistemas microtransportadores de tamaño menor a 100 µm, altos rendimientos y eficacias de encapsulación, así como una liberación controlada durante 20 días en el caso de la dexametasona y 4 meses para la proteína.

P.2. La pleiotrofina y la midkina regulan los efectos antinociceptivos inducidos por morfina a través de mecanismos independientes del tono alfa-2-adrenérgico.

Martín, Y.B., Gramage, E., Herradón, G. Universidad San Pablo-CEU.

La pleiotrofina (PTN) y la midkina (MK), son dos citoquinas funcionalmente muy redundantes y con capacidad neurotrófica, que se encuentran sobre-expresadas en situaciones de daño del tejido nervioso. Se ha demostrado que la administración de diferentes fármacos, como la morfina, regula de manera

significativa los niveles de expresión de estas citoquinas en el cerebro, lo que sugiere que PTN y/o MK podrían estar involucradas en los efectos farmacológicos inducidos por morfina. Para probar esta hipótesis, hemos estudiado los efectos antinociceptivos inducidos por morfina en ratones knockout de MK (MK^{-/-}), knockout de PTN (PTN^{-/-}) y en ratones salvajes (WT^{+/+}) empleando el test de la placa caliente y el test de la retirada de la cola. En situación basal, pudimos comprobar que las respuestas nociceptivas a nivel supraespinal no difieren entre ratones PTN^{-/-}, MK^{-/-} y WT^{+/+} en el test de la placa caliente. Sin embargo, las latencias basales en el test de retirada de la cola fueron significativamente mayores en ratones PTN^{-/-} en

comparación con MK^{-/-} y WT^{+/+}. No encontramos diferencias entre genotipos administrando una dosis alta de morfina (10 mg/kg) en el test de la placa caliente. Por el contrario, una dosis intermedia de morfina (5 mg/kg) retrasó significativamente la aparición de la respuesta dolorosa en ratones PTN^{-/-} en comparación con MK^{-/-} y WT^{+/+} en el test de la placa caliente. Por otra parte, los efectos antinociceptivos de la morfina (5 mg/Kg) en el test de la retirada de la cola aumentaron significativamente en ratones PTN^{-/-} y MK^{-/-} en comparación con ratones WT^{+/+}. Curiosamente, la co-administración de morfina con yohimbina (antagonista del receptor alfa-2-adrenérgico) no alteró los efectos antinociceptivos inducidos por morfina en ratones PTN^{-/-} y MK^{-/-} en el test de la retirada de la cola. Nuestros resultados sugieren un papel importante de PTN en la transmisión del dolor a nivel espinal y demuestran la modulación por parte de la PTN endógena de los efectos analgésicos de la morfina a nivel espinal y supraespinal. Los datos también demuestran que la MK regula significativamente la analgesia inducida por morfina a nivel espinal. A diferencia de PTN, la MK endógena no ejerce un papel importante en el procesamiento del dolor a nivel espinal y no altera la analgesia inducida por morfina a nivel supraespinal. Además, los datos demuestran que el aumento de los efectos antinociceptivos de la morfina a nivel espinal en ratones PTN^{-/-} y MK^{-/-} en comparación con los WT^{+/+} no están causados por un excesivo incremento en el tono noradrenérgico provocado por el opiáceo en ratones PTN^{-/-} y MK^{-/-}.

P.3. Regulación de CCL2/MCP-1 por receptores adrenérgicos en astrocitos.

Hinojosa, A. E., García-Bueno, B., Caso, J.R., Gárate, I., Madrigal, J.L.M. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, España.

Tras observar la inducción por noradrenalina (NA) de MCP-1/CCL2 (proteína quimioatrayente de monocitos) en astrocitos a través de la activación de receptores beta adrenérgicos, hemos analizado los mecanismos implicados en este proceso, en particular el efecto de fármacos antidepresivos moduladores de la NA. Así, hemos comprobado que el tratamiento de cultivos primarios de astrocitos con inhibidores de la recaptación de noradrenalina como desipramina o toxometina induce la expresión y síntesis de CCL2/MCP-1 en estas células. El efecto de ambos fármacos in vitro sugiere que la expresión de esta quimioquina podría modularse también por algún mecanismo independiente de la elevación de NA. Esto se ha confirmado al detectar una reducción en la producción de CCL2/MCP-1 en astrocitos tratados con el agonista del receptor alfa 2 adrenérgico clonidina. Además, el bloqueo de receptores alfa 2 adrenérgicos con yohimbina potenció la producción de MCP-1 causada por la activación de receptores beta adrenérgicos. Basándonos en estos datos podemos concluir que mientras que la activación de los receptores beta adrenérgicos y la consecuente elevación de AMPc parecen ser las vías más importantes para la inducción de MCP-1 por NA, nuestros datos indican que los receptores

alfa 2 adrenérgicos también participan inhibiendo la expresión de MCP-1. Estos resultados indican un posible efecto (antiinflamatorio/regulador) de fármacos antidepresivos que podría ser útil en procesos de neuroinflamación asociados a patologías neuropsiquiátricas.

P.4. Detección de hepatotoxicidad secundaria a fármacos a través de señales de laboratorio.

Pérez de la Campa, C., Sánchez Rojas, S.D., Sánchez Hernández, A., Ochoa Mazarro, M.D., Abad-Santos, F. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid.

El objetivo esencial de este estudio ha sido el de detectar los casos probables de hepatotoxicidad secundarios a fármacos en pacientes ingresados en el Hospital Universitario de la Princesa en Madrid. Para ello, mediante un programa diseñado por el Servicio de Informática del Hospital, se tratan de identificar aquellos pacientes que durante su ingreso presentan una elevación de la enzima GPT ≥ 3 veces el límite superior de la normalidad y/ o bilirrubina total (BT) ≥ 2 veces el límite superior de la normalidad. Posteriormente, se revisan sus historias clínicas y se realiza un seguimiento de los pacientes durante el ingreso hospitalario, o bien, si ya han sido dados de alta, la revisión de su historia clínica se realiza solicitando al archivo su historia. Los casos que se consideran probables reacciones adversas a medicamentos (RAM) son notificados de manera electrónica al Centro de Farmacovigilancia de la Comunidad de Madrid. Los resultados indicaron que desde el 28/09/2009 hasta el 31/05/2011, se han detectado 1159 señales, descontando las repetidas en un mismo paciente. De estas señales 74 (6.38%) se han considerado como probables casos de hepatotoxicidad por fármacos. Los principales fármacos implicados han sido los antibióticos (betalactámicos) y los anticonvulsivantes. Otros han sido los antifúngicos y levofloxacino. Estos datos sugieren que el sistema de señales de laboratorio es un método útil para la detección de reacciones adversas medicamentosas (RAM). Presenta una gran sensibilidad teórica para la búsqueda de este tipo de RAM dentro de los pacientes que son ingresados, pudiéndose realizar así una adecuada labor de farmacovigilancia. Este método es aplicable para muchas otras RAM.

P.5. Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of two product of Digoxin 0.25mg tablets after a single dose administration in healthy volunteers: an open, crossover randomised bioequivalence clinical trial.

Ochoa Mazarro M.D., Román Martínez M., Moreno Arza I., Sánchez Rojas S., Abad-Santos F. Clinical Pharmacology Service of Hospital Universitario de La Princesa. Instituto de Investigación Biomédica del Hospital de la Princesa.

Digoxin is a cardiotonic drug used as an antiarrhythmic, in atrial fibrillation. The main aims of our study were to evaluate the pharmacokinetic of two different formulations of digoxin 0.25 mg and to assess the bioequivalence. This was a randomized, single-centre, single-dose, crossover study. Forty young

healthy volunteers were enrolled. Each participant received a single oral dose of digoxin 0.25 mg, and the wash-out period was 14 days. Two market formulations containing digoxin were studied and designed as: product test, which is Digoxina test tablets 0.25 mg and product reference was Digoxina Teofarma reference tablets 0.25 mg, both of Laboratorios Teofarma S.r.L. Digoxin serum concentrations were determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters C_{max} and T_{max} were obtained directly from digoxin serum concentrations; $AUC_{0-\infty}$ (as the addition of $AUC_{0-t} + Ct/k$) was calculated by the linear trapezoidal rule for both digoxin. The pharmacokinetics parameters $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} were tested for bioequivalence after log transformation of data. Following administration of product test and product reference, the mean maximum serum concentration (C_{max}) was 1.64 ± 0.56 ng/ml and 1.76 ± 0.54 ng/ml respectively. These values were similar in both formulations ($p < 0.05$). The mean ratio of C_{max} "test over reference" was calculated as of 92.07 with 90% confidence intervals of 84.82-99.93, that is within the 80 to 125% interval proposed by the current regulations of the EMEA for bioequivalence. There was no significant difference in time to maximum concentration median T_{max} , it was 1h for both formulations. 90% confidence intervals of T_{max} calculated according to the Hauschke non parametric method were 83.5 to 116. The overall bioavailability judged from AUC_{0-72h} was found mean value ($\pm SD$) of Digoxina test was 21.06 (± 3.96) ng/mL and Digoxina reference was 20.49 (± 3.98). The ratio between logarithmically transformed means of Digoxina test and Digoxina Teofarma reference was 103.04 with a 90% CI of 97.36-109.06, that is within the 90 to 111% interval proposed by the current regulations of the EMEA for bioequivalence for drugs with narrow therapeutic range. These results suggest that both formulations of digoxin were found to be bioequivalents and therefore interchangeable.

P.6. Contribución de los diferentes subtipos de canales de calcio a la excitabilidad eléctrica en rodajas de glándula adrenal de rata.

Albiñana E., Hernández-Guijo J.M.

Hemos determinado las propiedades electrofisiológicas de las células cromafines en rodajas de glándula adrenal de rata (RRC_s), utilizando la técnica de patch clamp en configuración de parche perforado y caracterizando los canales de calcio implicados en la excitabilidad celular. Con un potencial de reposo de -56mV, las células cromafines de rata disparan potenciales de acción de forma espontánea, éstos se generan principalmente por la entrada de Na^+ y en menor medida por la de Ca^{+2} y finalmente terminan por la activación de canales de K^+ tanto calcio como voltaje dependientes. Pequeñas inyecciones de corriente generan potenciales de acción con una frecuencia aproximada de 7-9 Hz. La aplicación de bloqueantes de los diferentes subtipos de los canales de Ca^{+2} demostró que estos canales tienen distintos papeles en la generación y disparo de los potenciales de acción. La entrada de calcio a través de canales sensibles a nifedipino parece estar implicada en la repolarización e hiperpolarización del potencial de acción, así como para alcanzar el potencial umbral, mientras que los canales P/Q

parece que solo están parcialmente implicados en la fase de repolarización. Los canales N no parecen intervenir en la excitabilidad celular. Los canales de potasio calcio dependientes tienen un importantísimo papel en la excitabilidad en nuestro modelo de estudio. La aplicación de Cd^{+2} permitió conocer la importancia relativa real de la corriente de potasio dependiente de calcio. El bloqueo del canal de tipo L por nifedipino redujo la activación de la corriente a través de los canales BK en un 60%. En cambio, el bloqueo de los canales N o P/Q apenas mostraron efecto en la corriente de estos canales. A pesar de la presencia de al menos tres tipos de canales de calcio, la activación de los canales BK durante la repolarización y la hiperpolarización está acoplada predominantemente a la entrada de calcio a través de canales de calcio de tipo L, el cual apenas constituye el 45% del total de la corriente de calcio. Este estudio demuestra que los canales de calcio de tipo L juegan un papel clave en la modulación de la excitabilidad de las células cromafines de rata. Durante el potencial de acción, la entrada de calcio a través de canales de calcio sensibles a nifedipino es el responsable de la activación de canales de potasio que contribuyen a las fases de repolarización e hiperpolarización. Financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI080227) y la Fundación Teófilo Hernando.

P.7. Cambios en la excitabilidad de la membrana, movimiento vesicular y liberación cuantál en células cromafines de ratón excitadas por pulsos sostenidos de acetilcolina.

Calvo-Gallardo, E., Machado, D., Borges, R., García, A.G., de Diego, A.M.G. Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid; Unidad de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna

Las respuestas a acetilcolina (ACh) han sido ampliamente estudiadas en las células cromafines de varias especies animales, a saber: gato, perro, cerdo, vaca, rata, jerbo, cobaya y humano. La contribución de los receptores nicotínicos y muscarínicos a estas respuestas también ha sido extensamente analizada. Es sorprendente, sin embargo, que solo esté disponible un estudio con datos limitados sobre los efectos de los receptores muscarínicos en la excitabilidad de la membrana en médula adrenal intacta de ratón (Nassar-Gentina *et al.*, 1998, *Am J Physiol* 254:C675-83). Dado que los ratones C57 son ampliamente utilizados para desarrollar modelos transgénicos de diversas enfermedades, pensamos que sería de interés estudiar los efectos de una estimulación prolongada con 100 μM de ACh (para describir la respuesta transitoria de la activación del receptor nicotínico) en la excitabilidad de la membrana, liberación cuántica de catecolaminas y movimiento vesicular en células cromafines de ratones C57. La ACh produjo potenciales de acción seguidos de una despolarización sostenida. Estas dos fases pueden ser explicadas por una corriente de entrada que se inactiva rápidamente, seguida por una pequeña corriente residual no inactivable, producida por la ACh. La despolarización parece estar asociada al bloqueo por la ACh de las corrientes de salida de K^+ dependientes de Ca^{2+} . La ACh

activa una respuesta cuántica de vesículas únicas consistente en una ráfaga transitoria de espigas secretoras, seguida de una respuesta menor no inactivable; estas dos respuestas pueden ser asociadas, respectivamente, a la activación de los receptores nicotínicos y muscarínicos. Estas respuestas fueron paralelas a cambios similares en los movimientos vesiculares, como se observó con microscopía TIRF. Estos datos serán útiles para realizar experimentos comparativos para estudiar alteraciones de la excitabilidad celular y la liberación de neurotransmisores en ratones C57 transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer y de esclerosis lateral amiotrófica, ambas enfermedades de interés en nuestro laboratorio.

P.8. El agonista $\alpha 7$ nicotínico PNU 282987 reduce la muerte celular inducida por privación de oxígeno y glucosa: implicación de la microglia.

Parada, E., Egea, J., Negredo, P., Buendía, I., López, M.G. Instituto Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Farmacología y Terapéutica; Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Servicio de Farmacología Clínica. Hospital Universitario de la Princesa, Madrid Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia; Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

Tras evidenciar la protección post-estrés del agonista selectivo de los receptores nicotínicos $\alpha 7$, PNU 282987, en trabajos anteriores del grupo (Parada E, et al, 2010), nos propusimos investigar si el mismo compuesto era capaz de proteger en un modelo más complejo como es el cultivo organotípico de rodaja de hipocampo. Empleamos la privación de oxígeno y glucosa (POG) como modelo de isquemia "in vitro" en cultivos organotípicos de hipocampo rata de 8-9 días. La lesión celular se cuantificó usando las técnicas de medida de necrosis de iodo de propidio (IP) y del método de reducción del MTT. Tras 7 días en cultivo, las rodajas de hipocampo se sometieron a un periodo de privación de oxígeno y glucosa (POG) durante 15 minutos y, posteriormente, se mantuvieron durante 24 h. Tras dicho periodo la muerte celular incrementó a un 180,2±2,1 % respecto a la basal. El agonista nicotínico $\alpha 7$, incubado durante las 24 h post-POG, redujo la muerte celular de forma concentración dependiente; a la concentración de 10 μ M, el PNU 282987 redujo de forma significativa la muerte celular a un 110,1 ± 9,1 %. El PNU 282987 aumentó la expresión de la enzima antioxidante hemoxigenasa-1 (HO-1) hasta dos veces la basal, viéndose el mayor aumento de ésta a la concentración de 10 μ M. Para corroborar que la protección ofrecida por nuestro compuesto era debida fundamentalmente al aumento de la expresión de esta enzima, se usaron cultivos de rodaja de hipocampo de ratón KO Nfr2 (factor de transcripción que regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, entre ellos la HO-1). Para analizar el papel antiinflamatorio que podría ejercer el agonista nicotínico $\alpha 7$ en este modelo, se evaluó la expresión de la microglia activada. El PNU 28298 a 10 μ M revirtió la microgliosis producida

por la POG hasta niveles cercanos a la basal. También se midió la expresión de una de las citoquinas anti-inflamatorias más importante como es IL10 y de su receptor IL10R1A por Q-PCR. A la concentración de 10 μ M, el PNU 282987 duplicó la expresión de IL10. Para determinar la implicación de la microglia en el papel protector del PNU, se realizó la depleción "in vitro" de ésta, usando una toxina dirigida hacia este tipo celular, la Mac1-sap. Los resultados obtenidos sugieren que una intervención sobre los receptores nicotínicos $\alpha 7$ neuronales puede poner en marcha mecanismos antiinflamatorios e inducción de enzimas anti-oxidantes, como la HO-1, capaces de ofrecer neuroprotección ante un estímulo isquémico.

Financiado por MICIIN Ref:SAF2009-12150 e Instituto Carlos III Ref: RETICS-RD06/0026

P.9. Desconjugación vascular del glucurónido de quercetina.

Menéndez, C., Dueñas, M., Gonzalez-Manzano, S., Moreno, L., Cogolludo, A., Duarte, J., Santos-Buelga, S., Pérez-Vizcaino, F. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UCM. Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC). Madrid. Ciber Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Getafe, Madrid. Department of Pediatrics, Maastricht University Medical Center (MUMC+), School for Oncology and Developmental Biology (GROW), Maastricht, the Netherlands.

El consumo de flavonoides en la dieta se asocia con una reducción de la morbi-mortalidad cardiovascular. Dado que la quercetina, el principal flavonoide de la dieta, se metaboliza rápidamente dando metabolitos glucuronizados menos activos o inactivos y que las concentraciones de quercetina libre en plasma son muy bajas, se ha puesto en duda una gran cantidad de datos científicos acumulados durante décadas en ensayos *in vitro* con los compuestos no conjugados. En el presente estudio, nos planteamos estudiar si la quercetina-3-O-glucurónido (Q3GA) se puede desconjugar *in situ* y si esta desconjugación da lugar a un efecto biológico. La quercetina y el Q3GA se perfundieron a través del lecho mesentérico aislado. La quercetina se metabolizó rápidamente mientras que las concentraciones de Q3GA se redujeron lentamente, acompañadas de un aumento progresivo de quercetina en el líquido de perfusión y en el tejido durante 6h. Este efecto se previno por el inhibidor de β -glucuronidasa sacarolactona. La incubación de anillos de arteria mesentérica montados en un baño de órganos con Q3GA durante ≥ 1 h dio lugar a una inhibición significativa de la respuesta contráctil que también se previno con sacarolactona. Además, la administración intravenosa de Q3GA dio lugar a una reducción lenta y progresiva de la presión arterial, lo que demuestra por primera vez efectos *in vivo* del Q3GA. Estos datos sugieren que el Q3GA se comporta como un transportador de quercetina que se desconjuga *in situ* liberando la forma aglicona que es el efecto final.

P.10. Efecto de la metanfetamina en la activación de las metaloproteinasas: Implicación en la neurotoxicidad.

Urrutia, A., Rubio-Araiz, A., Gutierrez-López, M.D.; El Ali, A., Hermann, D.M., O'Shea, E., Colado, M.I. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

(+)-Metanfetamina (METH) induce, inmediatamente después de su administración, una respuesta hipertérmica y un proceso de estrés oxidativo/nitrosativo que están implicados en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la droga (Krasnova and Cadet, 2009). En diversos modelos experimentales ambos factores aumentan la actividad de las metaloproteinasas (MMPs) (Alam et al, 2011; Rosenberg, 2009). El objetivo es evaluar el efecto de METH sobre la expresión y actividad de MMPs y su relación con la neurodegeneración dopaminérgica producida por la droga. Ratones C57BL/6J recibieron METH (4mg/kg, i.p cada 3 horas, 3 veces consecutivas) a 22°C y a 4°C y se sacrificaron 1h, 3h, 24h y 7 días después. Un grupo de animales fue inyectado con el inhibidor de la actividad de MMPs Batimastat (50mg/kg, i.p. 30 min antes de la primera y última inyección de METH). En estriado se cuantificó la expresión de MMP-9, su actividad (zimografía en gel) y localización (zimografía in situ) así como la fosforilación de JNK1/2. Se cuantificó la concentración de dopamina (HPLC) y la densidad de su transportador (DAT) (^3H]-WIN 35,428). METH aumentó la expresión y actividad estriatal de MMP-9 1h después del tratamiento únicamente. Simultáneamente se observó un aumento en la fosforilación de JNK1/2. Cuando METH se administró a animales mantenidos a 4°C, el aumento en la actividad de MMPs fue sustancialmente menor. Una semana después de la administración de METH se observó una reducción en la concentración estriatal de dopamina y en la densidad de DAT, efectos que no fueron modificados por la administración de Batimastat. METH induce un incremento en la actividad y expresión de MMP-9 que es parcialmente dependiente de la respuesta hipertérmica que induce la droga pero que parece no estar implicado en la neurotoxicidad dopaminérgica.

Referencias:

1. Krasnova I and Cadet J. 2009. Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Res Rev*, 60, 379-407
2. Alam M, Mohammad A, Rahman S, Todd K, Shuaib A. 2011. Hyperthermia up-regulates matrix metalloproteinases and accelerates basement degradation in experimental stroke. *Neurosci Lett*, 495, 135-139
3. Rosemberg GA. 2009. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neur*, 8, 205-216

Financiado por: MICINN (SAF2010-21529; RD06/0001/006), PNSD (PR47/10-17826), UCM (910258), FEDER y RTA.

P.11. La activación de PPAR β/δ previene la alteración de la relajación vía AMPc en arterias coronarias expuestas a alta glucosa.

Barreira, B., Moral, J., Moreno, L., Moreno, E., Menéndez, C., Escolano, L., Duarte, J., Pérez Vizcaíno, F., Cogolludo, A. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

En diversos modelos de diabetes se ha encontrado que, además de disfunción endotelial, las arterias coronarias muestran una reducida relajación inducida por la vía del AMPc. En los últimos años, se ha puesto de manifiesto que los agonistas de PPAR β/δ producen efectos beneficiosos en diversas patologías tales como la hiperlipidemia, la aterosclerosis, la obesidad y la diabetes. El objetivo del presente estudio es determinar el posible efecto protector de los agonistas PPAR β/δ sobre la relajación inducida por la vía del AMPc en la diabetes experimental. Para ello, se utilizaron anillos de arteria coronaria de ratas Wistar macho incubados durante 20 horas en un medio con un contenido de glucosa bajo (5mM) o alto (30mM), en ausencia o en presencia de GW0742 (10^{-6} M o 10^{-5} M), agonista selectivo de PPAR β/δ . Las arterias coronarias, pero no las pulmonares, presentaban una menor relajación al activador de AMPc forskolina tras la incubación con alta glucosa. El tratamiento con Gw0742 aumentaba de manera concentración dependiente la relajación inducida por forskolina y su efecto se prevenía en presencia del antagonista selectivo de PPAR β/δ GSK0660 (10^{-6} M). El tratamiento con el inhibidor de los canales Kv (DPO-1, 10^{-6} M), reducía la relajación inducida por forskolina en arterias coronarias expuestas a baja glucosa o a alta glucosa + Gw0742 pero no en las incubadas con alta glucosa + vehículo. Así, en presencia de DPO-1, la relajación inducida por forskolina era similar en los tres grupos. En conclusión, la exposición a alta glucosa reduce la relajación inducida por la vía del AMPc, mediada a través de la activación de canales Kv, en arterias coronarias. La activación de receptores PPAR β/δ previene dicha alteración. Por tanto, nuestros datos sugieren que la activación de receptores PPAR β/δ tiene una acción beneficiosa sobre la disfunción vascular diabética.

P.12. Irvalec® Inserts into the Plasma Membrane Causing Rapid Loss of Integrity and Necrotic Cell Death in Tumor Cells.

Macías, A., David, M., Moreno, C., de la Cruz, A., Prieto, A., González, T., Galmarini, C.M., Valenzuela, C. Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM). Madrid.

Irvinec® (PM02734, Elisidepsin) is a marine-derived cytotoxic depsipeptide that is currently undergoing phase II clinical studies in non-small cell lung cancer. In vitro treatment of tumor cells with Irvinec® induces necrotic cell death, a process associated with rapid loss of membrane integrity and subsequent

cell permeabilization. These results suggested an effect of the drug, either on an ion channel or in the plasma membrane. In order to explore this hypothesis patch-clamp experiments were performed in different tumor cell lines (HeLa, A549 and HCT116). Treated cells underwent rapid and dramatic morphological changes, including cell blebbing, severe swelling, plasma membrane permeabilization and cell lysis. Apart from the numerous small blebs, membranes from damaged cells also re-organized to form enormous bubbles surrounded by cell membrane. Using electrophysiological techniques, it was shown that Irvalec® induced an important increase in membrane conductance. The compound permeabilized the plasma membrane to ions, even when the cells were not pulsed, causing important changes in the holding current. It has been described that zinc attenuates the drastic effects of some membrane disrupting agents. Hence, to test if zinc exerted some protective effect against Irvalec® effects, cells were treated with this drug in the presence or absence of zinc salts and its membrane permeability was analyzed by using electrophysiology techniques, measuring the variations in the ion currents induced by the drug. Interestingly, in cells treated with zinc (10 mM), a decrease in the membrane permeability induced by Irvalec® was observed. Altogether, these results suggest that Irvalec® induces a rapid membrane permeabilization that lead to a necrotic cell death.

Supported by CICYT SAF2010-14916 and FIS (RD06/0014 /0006) Grants.

P.13. Actividad antiinflamatoria del diterpeno ácido metil éster labdanoico (LAME) en un modelo de sepsis en ratón.

Cuadrado, I., Cidre, F., Herranz, S., Estevez-Braun, A., de las Heras, B., Hortelano, S. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid. Unidad de Inflamación y Cáncer. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González". Universidad de La Laguna, Tenerife.

Los productos naturales siguen constituyendo una fuente potencial de nuevos agentes terapéuticos. En estudios previos hemos evaluado la actividad antiinflamatoria de una serie de diterpenos labdánicos derivados del labdanediol, capaces de inhibir la liberación de mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) y prostaglandina E₂ (PGE₂) en macrófagos RAW 264.7⁽¹⁾, siendo el diterpeno ácido metil éster labdanoico (LAME) el más activo. En este trabajo hemos evaluado las distintas vías de señalización implicadas en el efecto antiinflamatorio del diterpeno LAME, así como su posible efecto terapéutico en un modelo de sepsis en ratón. Nuestros resultados muestran que LAME es capaz de inhibir la liberación de los mediadores NO, PGE₂ y citoquinas implicadas en el proceso inflamatorio (IL-6, TNF- α e IP-10) en macrófagos. Mediante técnicas de Western blot y PCR cuantitativa se confirmó la potente inhibición que el compuesto LAME ejerce sobre la expresión de las proteínas NOS-2 y COX-2 a nivel transcripcional. Dichos efectos antiinflamatorios parecen estar mediados por la inhibi-

ción del factor de transcripción nuclear NF- κ B y el bloqueo de la expresión de las proteínas fosforiladas ERK y JNK, pertenecientes a la familia de las MAPKs. Utilizando un modelo *in vivo* de sepsis inducida por el lipopolisacárido LPS en ratones se observó que LAME aumentaba la supervivencia de los animales tratados, disminuyendo los niveles circulantes de citoquinas (TNF- α e IL-6). En conjunto, los datos obtenidos muestran que LAME podría constituir una estrategia terapéutica en el tratamiento del proceso inflamatorio durante la sepsis.

(1) Girón N, Pérez-Sacau E, López-Fontal R, Amaro-Luis JM, Hortelano S, Estevez-Braun A, de las Heras, B.. *Eur. J. Med. Chem.* 45: 3155-3161 (2010).

P.14. Alteraciones en la función de las innervaciones adrenérgica y nitrérgica inducidas por LPS.

Sastre, E., Blanco-Rivero, J., Lahera, V., Balfagón, G.. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

El shock endotóxico se caracteriza por hipotensión, colapso vascular y fallo orgánico múltiple. El tono vascular de la arteria mesentérica está regulado, entre otros mecanismos, por las innervaciones adrenérgica y nitrérgica. No existen estudios que analicen el efecto del LPS, utilizado como modelo de shock endotóxico, en la regulación del tono vascular mesentérico por la innervación adrenérgica y nitrérgica. Se utilizaron segmentos control e incubados con 10 μ g/mL de LPS (2 y 5 horas) de arteria mesentérica superior de ratas macho Wistar. Se analizó en ambos grupos la respuesta a estimulación eléctrica (EE, 200 mA, 0.3 ms, 1–8 Hz, 30 s) en presencia/ausencia de 0.1 mmol/L del inhibidor inespecífico de la óxido nítrico sintasa (NOS) L-NAME. Se analizó la respuesta vasomotora a noradrenalina (NA) y al donante de óxido nítrico (NO) DEA-NO, la liberación de NA y NO, y la expresión proteica de la NOS neuronal fosforilada (P-nNOS). La exposición a LPS indujo una respuesta bifásica: a las 2 horas la respuesta contráctil a EE se incrementó, mientras que a las 5 horas la respuesta contráctil disminuyó a los niveles control. La preincubación con L-NAME incrementó la respuesta vasoconstrictora a todas las frecuencias. Este incremento fue menor en arterias preincubadas con LPS tanto a las 2 como a las 5 horas. La respuesta a NA fue mayor en ratas incubadas con LPS a las 2 horas, mientras que a las 5 horas fueron similares a la situación control. La liberación de NA no se modificó por la preincubación con LPS. El tratamiento con LPS en ningún caso modificó la respuesta vasodilatadora a DEA-NO. La liberación basal de NO aumentó por la preincubación con LPS. Este aumento se vio abolido por el tratamiento con el inhibidor de la iNOS 1400W. La liberación de NO inducida por EE y la expresión de P-nNOS disminuyeron con el tratamiento con LPS en igual medida a las 2 y las 5 horas. Estos resultados sugieren que tras la incubación con LPS durante 2 horas, las innervaciones adrenérgica y nitrérgica tratan de contrarrestar la vasodilatación inducida por LPS, mediante una disminución de la función nitrérgica y un aumento de la función adrenérgica.

La preincubación con LPS durante 5 horas mantiene la disminución en la función nitrérgica y restablece la función adrenergica. Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-10374).

P.15. El CGP37157 protege a las neuronas de la corteza motora frente a la citotoxicidad producida por el glutamato.

Arranz Tagarro, J.A., Yáñez Jato, M., Merino Sanz, C. García, A.G. Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. España. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de los mamíferos. Presenta diversos receptores, entre los que se encuentran los receptores N-metil-D-aspartato (receptores NMDA). La citotoxicidad producida por exceso de glutamato está mediada por la activación de estos receptores, produciéndose un aumento en la concentración citosólica del catión calcio ($[Ca^{2+}]_c$) de forma crónica por encima de unos niveles críticos que desencadena una cascada de reacciones patológicas que causan la muerte neuronal. La circulación mitocondrial del Ca^{2+} (mCC) se debe a la acción de dos transportadores: el captado por el uniportador y el liberado por el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (mNCX). Esta mCC mitiga los cambios bruscos de la $[Ca^{2+}]_c$ que se producen durante la actividad neuronal, manteniéndose en niveles adecuados para el funcionamiento óptimo de las neuronas. Considerando lo expuesto con anterioridad, nos propusimos en este estudio investigar si la modulación farmacológica del mNCX podría tener efectos neuroprotectores en las neuronas de la corteza motora sometidas a estrés por glutamato, empleando para ello el CGP37157 (CGP), que es un inhibidor del mNCX. Las neuronas se sometieron a estrés por glutamato a las concentraciones (0.1 y 1) mM de forma aguda y crónica, y se trataron con CGP a las concentraciones (0.3, 1, 3, 10 y 30) μ M. El protocolo que seguimos fue una preincubación con el fármaco durante 24 horas, tras las que se añadió el glutamato. Éste se dejó una hora (agudo) o 24 horas (crónico) en coincubación con el fármaco. En el primer caso, cuando se eliminó el glutamato, se adicionó a los pocillos medio nuevo con el fármaco hasta alcanzar las 24 horas. Finalmente, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT. Nuestros resultados muestran una protección estadísticamente significativa a las concentraciones (3, 10 y 30) μ M, salvo en el caso de la incubación crónica durante 24 horas con glutamato a la concentración 1 mM donde solo protegía la concentración más alta de CGP (30 μ M). En base a los resultados obtenidos y conociendo que el CGP produce un bloqueo parcial de los canales de calcio dependientes de voltaje de la membrana plasmática, existe la posibilidad de que tal efecto, unido a su acción inhibitoria del mNCX, contribuya a la neuroprotección.

P.16. Influencia del envejecimiento en la respuesta vasoconstrictora inducida por estimulación eléctrica en arteria mesentérica de ratas hembra.

Del Campo, L., Sagredo, A. Aras, R., Ferrer, M. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

Se ha descrito que tanto el sistema nervioso como el endocrino modulan la función vascular. Así, en la arteria mesentérica de rata, la inervación ejerce un importante papel en la regulación del tono vascular a través de la liberación de los neurotransmisores noradrenalina (NA), óxido nítrico (NO) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). A su vez, las hormonas sexuales modulan la liberación y función de los distintos neurotransmisores. Por otra parte, está descrito que el envejecimiento, que cursa con niveles disminuidos de hormonas sexuales, está fuertemente asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares cuya incidencia es sexo-dependiente. Puesto que la mayoría de los estudios han analizado la influencia del envejecimiento sobre la función endotelial en animales macho, el objetivo del presente estudio es analizar el efecto del envejecimiento sobre la regulación nerviosa del tono vascular en animales hembra. Para ello se utilizaron ratas hembra jóvenes (6 meses) y envejecidas (22 meses), en las que se analizaron la presión arterial y los niveles séricos de 17 β -estradiol y progesterona. En la arteria mesentérica superior se analizaron: la respuesta contráctil y la liberación de NA, NO y CGRP inducidas por estimulación eléctrica, y la respuesta vasomotora inducida por el donante de NO nitroprusiato sódico (SNP), CGRP y NA añadidos exógenamente. Los resultados obtenidos mostraron que el envejecimiento: (i) no modificó la presión arterial; (ii) disminuyó los niveles séricos de estradiol y progesterona; (iii) no modificó la liberación de NA e incrementó la respuesta contráctil a NA exógena; (iv) disminuyó la liberación de CGRP, mientras que no modificó la respuesta vasodilatadora a CGRP exógeno; (v) no modificó la liberación de NO ni la respuesta vasodilatadora a SNP. Estos resultados indican que el incremento en la respuesta a NA y la disminución en la liberación de CGRP, inducidas por el envejecimiento, podrían participar en el incremento de la respuesta vasoconstrictora observada en estos animales. Asimismo, los cambios inducidos por el envejecimiento podrían correlacionarse con niveles disminuidos de hormonas sexuales. A pesar de estas modificaciones, la presión arterial no se modifica por el envejecimiento lo que indica que otros mecanismos podrían estar interviniendo para compensar las alteraciones descritas. Financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI080831).

P.17. Efecto neuroprotector del ITH33/IQM9.21 en modelos de toxicidad inducida por kainato.

González Curull, L., Egea, J., Negredo, P., Martín de Saavedra, M.D., Morgado Sanchez, A., Buendía Abaitua, I., Parada, E., López, M.G. Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

El ITH33/IQM9.21 (N-benzoyl-LGLu[NH-2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethyl]-O-nHex) es un compuesto nuevo perteneciente a la familia de los derivados glutámicos sintetizado en el Instituto de Química Médica-CSIC (Drs. Rodríguez-Franco, Conde y Arce). Este compuesto ha sido diseñado y sintetizado como un ligando multidiana con el fin de producir un efecto neuroprotector más eficiente al actuar en varias de las vías de señalización que llevan a la muerte neuronal. El objetivo de este estudio ha sido evaluar el potencial efecto neuroprotector del ITH33/IQM9.21 tanto en modelos *in vitro* (rodajas de hipocampo de rata) como en modelos *in vivo* (inyección intrahipocámpal en ratas) en un modelo de excitotoxicidad inducida por kainato. En el modelo *in vivo*, a las ratas SD se les inyectó salino, o kainato (800 mM) solo o junto con el compuesto según las coordenadas: -3 mm anteroposterior, 2 mm mediolateral y 3,5 mm de altura, para acceder al hipocampo. Se inyectó un volumen final de 2,5 µL en 2,5 minutos. Pasados tres días tras la inyección intrahipocámpal se sacrificaron los animales y se realizaron secciones cerebrales; éstas se tiñeron con Nils y se contó el número de neuronas piramidales en CA3 mediante esterología. Se evaluaron las concentraciones de 3 y 10 mM de ITH33/IQM9.21. La concentración de 3 mM no ofreció protección significativa, pero la de 10 mM consiguió rescatar un 45% de las neuronas piramidales en CA3. En el modelo *in vitro*, en las rodajas de hipocampo de rata expuestas a kainato (500 mM) durante 2 h, aumentó la muerte celular a un 150% respecto a la basal, en la región CA3. En estas condiciones experimentales, la co-incubación del compuesto ITH33/IQM9.21 (a 1 µM, 3 µM o 10 µM) con el tóxico ofrecía una protección máxima de 28% a la concentración de 10 mM. La muerte celular se ha evaluado mediante la doble tinción con yoduro /Hoescht. También se ha evaluado la producción de ROS y el potencial de membrana mitocondrial con las sondas fluorescente DCFDA y TMRE, respectivamente, y se han cuantificado proteínas por western blot. Con el fin de determinar que rutas neuroprotectoras median la acción del compuesto, en otra serie de experimentos observamos que el antagonista de la vía PI3K/Akt (LY294002) bloquea las acciones protectoras del ITH33/IQM9.21, mientras que el antagonista de ERK1/2 (PD098059) no produce un bloqueo significativo en las acciones protectoras del compuesto. Por tanto, estos datos sugieren que la vía de señalización intracelular PI3K/Akt participa en el mecanismo neuroprotector del ITH33/IQM9.21. En conclusión, estos experimentos muestran la capacidad neuroprotectora del ITH33/IQM9.21 convirtiéndolo en un fármaco potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades donde la viabilidad neuronal se ve afectada, como en el caso de la isquemia cerebral o ciertas enfermedades neurodegenerativas.

Financiado por MICINN SAF2009/12150, Instituto de Salud Carlos III RETICS-RD06/0026 y Comunidad Autónoma de Madrid Ref. SAL2006/0275

P.18. El eje angiotensina-(1-7)/mas exhibe propiedades antiinflamatorias en células vasculares humanas de músculo liso.

Villalobos, L., Romacho, T., Cercas, E., Elgueta, V., Sánchez-Ferrer, C.F., Peiró, C. Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

La angiotensina (Ang)-(1-7) es un heptapéptido que ejerce sus acciones a través del receptor Mas acoplado a proteínas G y que posee acciones contrarias a la Ang II. El objetivo de este trabajo fue: 1) Determinar la posible acción antiinflamatoria de la Ang-(1-7) en células de músculo liso de aorta humana (CMLAH) estimuladas con Ang II o la citoquina interleuquina (IL)-1 β , como molécula inflamatoria independiente del sistema renina angiotensina (SRA), 2) Estudiar el papel del receptor Mas como mediador de dicha acción, y 3) Definir la ruta de señalización celular por medio de la cual el eje Ang-(1-7)/receptor Mas ejerce su acción antiinflamatoria en las CMLAH. Los niveles de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), se determinaron por Western blotting y los niveles de liberación de óxido nítrico (NO) por el método de Griess. La actividad de la enzima NADPH oxidasa se determinó por el método de quimioluminiscencia derivada de lucigenina. La inducción de la activación del factor de transcripción NF- κ B, se detectó por el ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).

La estimulación de las CMLAH con (Ang II)-(100 nM) o (IL)-1 β (2,5 ng/ml) durante 18 horas aumentó significativamente los niveles de iNOS y la liberación de NO. En presencia de la Ang-(1-7) (100 nM), la inducción de iNOS y la liberación de NO inducida por Ang II e (IL)-1 β disminuyeron significativamente. Dicho efecto de Ang-(1-7) se abolió en células pretratadas con el antagonista del receptor Mas A779 (1 µM). Análogamente, la estimulación de las CMLAH con Ang II e (IL)-1 β provocó un aumento de la actividad NADPH oxidasa, que se vio reducida por la Ang-(1-7) en un 44% y 53%, respectivamente. También se determinó la activación del factor de transcripción NF- κ B por Ang II e (IL)-1 β , que disminuyó en presencia de la Ang-(1-7) en un 44% y 40%, respectivamente. El antagonista del receptor Mas A779 (1 µM), abolió significativamente la acción inhibitoria de la Ang-(1-7) sobre la activación de la NADPH oxidasa y de NF- κ B. Finalmente, para establecer la secuencia de señalización de la acción antiinflamatoria de la Ang-(1-7) se emplearon inhibidores como la apocinina y el PDTC, que bloquean a la enzima NADPH oxidasa y al factor de transcripción NF- κ B, respectivamente. Así, la apocinina (30 µM) redujo los niveles de iNOS inducidos por Ang II e (IL)-1 β en un 37% y 50%, respectivamente y la liberación de nitritos en un 57% y 45%, respectivamente. En presencia PDTC (100 µM), los niveles de iNOS inducidos por Ang II e (IL)-1 β disminuyeron significativamente en un 42% y 53%, respectivamente. Estos resultados sugieren que la Ang-(1-7) a través del receptor Mas previene parcialmente la inflamación del músculo liso vascular inducida

no sólo por Ang II, sino también por otras moléculas inflamatorias independientes del SRA, como la IL-1 β . La Ang-(1-7) atenúa dicha inflamación mediante el bloqueo de la enzima NADPH oxidasa y la inactivación del factor de transcripción NF- κ B, lo que se manifiesta en una disminución de la expresión de iNOS y la liberación de NO.

P.19. Predicción del Síndrome de Gilbert mediante el polimorfismo UGT1A1*28.

Román, M., Cabaleiro, T., Ochoa M.D., Tategón, M., Abad-Santos, F. Servicio de Farmacología Clínica. Hospital Universitario de la Princesa. ITH. Madrid.

El síndrome de Gilbert (SG) es una alteración crónica caracterizada por una hiperbilirrubinemia leve, no conjugada y no hemolítica. Está causado por alteraciones en la UDP-glucuronosiltransferasa (UGT1A1), su polimorfismo más común es el UGT1A1*28. El objetivo de este trabajo es comparar los niveles de bilirrubina total (BT), así como las enzimas hepáticas, con los genotipos de las enzimas metabólicas de fase II en voluntarios sanos. Para la determinación de los genotipos de las enzimas metabolizadoras de fase II se extrajo DNA de 168 voluntarios. La determinación de cada uno de los polimorfismos se llevó a cabo mediante un chip de genotipado, (Pharmachip®). Las determinaciones bioquímicas de los voluntarios se obtuvieron mediante las analíticas de reclutamiento de 5 ensayos clínicos de bioequivalencia. Un 94% de los voluntarios (n=158) tenían niveles de BT normales ($M \pm DS$ 0.66 \pm 0.25) y un 6% (n=10) tenían bilirrubinas altas ($M \pm DS$ 1.58 \pm 0.30). No encontramos diferencias entre las medias de concentración de BT entre hombres y mujeres. Un total de 77 sujetos presentaban la variante *1/*1 de UGT1A1 (45.8%), 82 voluntarios la variante *1/*28 (48.8%) y 9 voluntarios la variante *28/*28 (5.4%). Los voluntarios con genotipo *28/*28 tienen una mayor concentración de BT en sangre (1.24 \pm 0.52 mg/dl) con respecto a los que tienen el genotipo *1/*1 (0.63 \pm 0.24 mg/dl) ($p \leq 0.001$) así como con los heterocigotos *1/*28 (0.73 \pm 0.33 mg/dl) ($p \leq 0.001$). Los pacientes con esta mutación no tienen alteraciones de las demás enzimas analizadas. No hay ninguna relación de los polimorfismos de las otras enzimas de fase II con la elevación de BT u otros parámetros. Estos resultados sugieren que, de los parámetros analizados, sólo obtuvimos una relación entre los niveles de BT y el gen UGT1A1. Los voluntarios con la BT alta son homocigotos para la mutación UGT1A1*28, mientras que los individuos heterocigotos para dicha mutación solo presentan niveles altos de BT en algunos casos. La elevación de BT no se asocia a ningún otro polimorfismo estudiado. Por último concluimos que se puede considerar que el genotipo del polimorfismo UGT1A1*28 es útil para el diagnóstico del Síndrome de Gilbert.

P.20. Design of a polymeric microparticle formulation of prilocaine.

Bragagni, M.¹, Gil Alegre, M.E.², Mura, P.A.³. 1. Department of Pharmaceutical Sciences. Faculty of Pharmacy. University of Florence (Italy). 2. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de

Madrid. 3. Departamento de Ciencias Farmaceuticas. Facultad de Farmacia. Universita' degli Studi di Firenze (Italia).

The use of injectable local anesthetics for the treatment of severe postoperative pain is limited by the short duration of the painkilling effect. A time controlled delivery system could avoid several administrations, use of catheters and hospitalization. The aim of the work was the development, optimization and characterization of an injectable microparticle formulation of prilocaine, an amino-amide type local anesthetic suitable for intravenous, subcutaneous and intramuscular administration. The base form of the drug was extracted in dichloromethane from an alkalized suspension of prilocaine hydrochloride. Microparticles were prepared by double emulsion method using PLGA polymer (type RG504) and polyvinyl alcohol (PVA). In order to calculate the efficacy of encapsulation, the content of non-encapsulated drug in the filtrate was assayed by UV-VIS spectrophotometry (indirect determination). The encapsulated drug was quantified after disruption of microparticles in organic solvents (direct determination). The morphology and size of MP were investigated by microscopy and dynamic light scattering analysis. In order to optimize the formulation, the variation of several parameters was investigated: concentration of PVA, use of isopropanol and span 80 in the formation of the emulsions, pH and volumes of the aqueous phases. In vitro drug release studies of the optimized formulation were also performed. Microparticles of PLGA encapsulating the local anesthetic prilocaine were developed and fully characterized. The optimized formulation, biocompatible and able to provide a sustained drug release, could represent a novel pharmacological tool in the treatment of postoperative pain.

P.21. El nuevo compuesto neuroprotector y multidiana ITH33/IQM9.21 bloquea la entrada de calcio y la exocitosis en células cromafines.

Maroto, M., de Diego, A.M.G., Albiñana, E., Fernandez-Morales, J.C., Caricati-Neto, A., Jurkiewicz, A. Yáñez, M., Rodriguez-Franco, M.I., Conde, S., Arce, M.P., Hernández-Guijo, J.M., García, A.G. Instituto Teófilo Hernando; Departamento de Farmacología y Terapéutica; Instituto Sanitario de Investigación, Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Madrid. Departamento de Farmacología, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brasil. ⁶Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

El nuevo compuesto ITH33/IQM9.21 (ITH/IQM) pertenece a una nueva familia de derivados del aminoácido L-GLUTÁMICO con propiedades antioxidantes y neuroprotectoras en modelos de ictus isquémico tanto *in vivo* como *in vitro*. Ya que el lesión neuronal que se produce tras un insulto isquémico está estrechamente relacionado con una excesiva entrada del catión Ca²⁺, nos propusimos en este estudio investigar si el compuesto bloqueaba las señales de Ca²⁺ citosólicas ([Ca²⁺]

γ) y la consiguiente respuesta excitotónica ante estímulos despolarizantes. En poblaciones de células cargadas con la sonda fluo-4, el compuesto ITH/IQM redujo la $[Ca^{2+}]_c$ evocada por pulsos de K^+ con una CI_{50} de 5,31 μM . En células cargadas con fura-2 y a la concentración de 10 μM , el ITH/IQM disminuyó tanto el área como la amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} evocado por alto K^+ en un 40% y 80%, respectivamente. Esta misma concentración también bloqueó la secreción cuantil de catecolaminas evocada por K^+ en célula única (78%) y en poblaciones (55%). Todos estos efectos fueron consecuencia del bloqueo de los canales de calcio voltaje-dependientes (CCVD). El compuesto mostró una CI_{50} de 6,52 μM en la disminución de la corriente global de Ca^{2+} que permeaban tales canales. A 10 μM , el ITH/IQM también bloqueó la corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} dejando el componente voltaje dependiente totalmente intacto. La corriente de entrada de Na^+ nunca se vio afectada. Con todo esto, creemos que gran parte de los efectos del compuesto aquí descritos podrían contribuir en la neuroprotección ejercida por el ITH/IQM en las neuronas vulnerables durante un insulto isquémico-cerebral.

P.22. Anti-inflammatory effects of acanthoic acid-derived diterpenoids.

Pimentel Santillana, M., González Través, F., Terrón Arcos, V., Martín Sanz, P., Boscá Gomar, L.

In last years the level of research activity into terpenoids has increased to search for new anti-inflammatory natural products; however, only few reports have examined the mechanisms involved in the anti-inflammatory actions of these molecules. In this study, five acanthoic acid-derived molecules were tested for potential anti-inflammatory activity. One of these compounds, DTP5, was selected to evaluate its effects on the generation of inflammatory mediators in peritoneal macrophages activated with different TLR ligands. The results obtained showed that DTP5 exerts potent inhibitory effects on the expression of NF- κB responsive genes, such as iNOS and COX-2, after stimulation with TLR2, TLR3 and TLR4 ligands. In addition, we observed a clear inhibition of pro-inflammatory cytokines released after stimulation with TLR ligands. Examination of the effects of this diterpenoid on NF- κB signaling showed that DTP5 inhibits IKK phosphorylation, preventing the I κB - β degradation, after activation with TLR2 and TLR4 ligands. However, there weren't effects with TLR3 ligand. Inhibition of MAPKs pathways was also analysed. p-p38 was reduced in macrophages stimulated with TLR ligands and pre-treated with DPT5, while p-ERK was decreased only in LPS-stimulated macrophages and JNK phosphorylation induced by LPS, poly(I:C) and LTA, was unaffected by DTP5. On the other hand, treatment of macrophages with diterpenoids resulted in an up-regulation of Akt phosphorylation, suggesting that this Akt phosphorylation induced by DTP5 could explain some anti-inflammatory effects observed with this diterpenoid. In conclusion, the anti-inflammatory effects of this compound, together with its low cell toxicity, suggest potential therapeutic applications in the regulation of the inflammatory response.

P.23. Las especies reactivas de oxígeno participan en la hipertensión y en las alteraciones cardiovasculares inducidas por angiotensina II.

Avendaño, M.S., Martínez-Revelles, S., García-Redondo, A.B., Aguado, A., Alonso, M.J., Briones, A.M., Salaices, M.1 Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

En la hipertensión se ha descrito un incremento en los niveles de Angiotensina II (Ang II) que se ha asociado a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido generado por la NADPH oxidasa, los cuales a su vez, pueden contribuir a las alteraciones en la función vascular descritas en esta patología. El propósito de este estudio fue analizar la participación de ERO en la hipertensión, la hipertrofia cardíaca y en las alteraciones en las respuestas funcionales en aorta de ratón infundidos con Ang II. Se utilizaron los siguientes grupos de ratones C57BL6 (25-35 gr): 1) control; 2) tratados con AngII (minibomba osmótica subcutánea, 1440 $\mu g/kg/día$, 14 días); 3) tratados con AngII y el inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina (1.5 mM) y 4) tratados con AngII y un mimético de la superóxido dismutasa 1(SOD1), Mito-TEMPO (0.7 mg/Kg/día). La presión arterial se midió mediante pletismografía de cola. Se determinó la hipertrofia del ventrículo izquierdo y las respuestas funcionales de la aorta se analizaron mediante miógrafo de alambres. La producción "in situ" de O_2^- y de óxido nítrico (NO) se determinaron mediante las sondas fluorescente hidroetidina (HE) y diaminofluoresceína (DAF), respectivamente. Los resultados indicaron que la infusión con Ang II incrementó la presión arterial y tanto el tratamiento con apocinina como con Mito-Tempo disminuyeron dicho efecto (Control: 95 ± 3.4 mm Hg; AngII: 146 ± 6.7 mm Hg $p < 0.0001$ vs control; AngII + apocinina: 133.67 ± 5.7 mm Hg $p < 0.01$ vs AngII, AngII + Mito-Tempo: 118.7 ± 4.3 mm Hg $p < 0.001$ vs AngII). Ang II produjo hipertrofia del ventrículo izquierdo que se mejoró en parte, con ambos tratamientos antioxidantes. El tratamiento con Ang II aumentó la respuesta contráctil a fenilefrina (1 nM-100 μM) la cual se normalizó tras el tratamiento con apocinina. El inhibidor no selectivo de la sintasa del óxido nítrico L-NAME (100 μM) aumentó la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina menos en aorta de ratones infundidos con AngII que en ratones controles. Además, AngII aumentó la formación de O_2^- y disminuyó la liberación de NO así como la respuesta relajadora a acetilcolina (1 nM-10 μM) sin modificar la respuesta vasodilatadora al donador de NO, DEA-NO. El tratamiento con apocinina normalizó el efecto potenciador del L-NAME, disminuyó la formación de O_2^- , incrementó la liberación de NO y mejoró la disfunción endotelial producida por Ang II. Por otro lado, la incubación de los segmentos con apocinina (300 μM), NS 398 (inhibidor de COX-2, 1 μM) o SC 560 (inhibidor de COX-1, 1 μM), redujo la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina más en ratones infundidos con Ang II que en ratones controles. El tratamiento con apocinina abolió los efectos inhibidores del NS 398, SC 560 y apocinina en los ratones infundidos con AngII. Estos resultados sugieren que las especies reactivas de oxígeno derivadas de la NADPH Oxidasa y/o de origen mitocondrial

participan en la hipertensión, en las alteraciones cardíacas y en el incremento de las respuestas vasoconstrictoras inducidas por AngII posiblemente a través de la disminución de NO. Además, las especies reactivas de oxígeno son responsables de la incrementada participación de prostanoides en las respuestas vasoconstrictoras inducida por Ang II.

Financiado por MICINN (SAF 2006-02376, SAF 2009-07201) ISCIII (Red RECAVA, RD06/0014/0011) y FMM.

P.24. La propafenona modula los canales cardiacos de K⁺ con rectificación interna Kir2.x.

Gómez, R., Caballero, R., Amorós, I., Barana, A., Dolz, P., de la Fuente M.G., Tamargo, J., Delpón, E. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

El aumento de la corriente de K⁺ con rectificación interna (I_{K1}) estabiliza y acelera el giro de los frentes espirales que originan las arritmias fibrilatorias. La I_{K1} es generada por homotetrámeros de proteínas Kir2.1 a nivel ventricular y por heterotetrámeros de proteínas Kir2.1, 2.2, y 2.3 a nivel auricular. La propafenona (P) es un antiarrítmico muy eficaz para el tratamiento de la fibrilación auricular que presenta efectos proarrítmicos a nivel ventricular que limitan su uso. En este trabajo hemos analizado los efectos de P sobre la I_{K1} registrada en miocitos auriculares procedentes de pacientes sometidos a cirugía cardíaca y sobre las corrientes generadas por canales Kir2.1, 2.2, y 2.3 registradas utilizando la técnica del parche de membrana en células de ovario de hámster chino transfectadas transitoriamente. La P (1 μ M) no modifica la I_{K1} registrada en miocitos auriculares humanos. La P a concentraciones en el rango 0.01-10 μ M aumenta, mientras que a concentraciones más altas (20-100 μ M) inhibe la $I_{Kir2.1}$ generada a potenciales de membrana más despolarizados del potencial de inversión del K⁺. Por el contrario, la P no aumenta la $I_{Kir2.2}$ ni la $I_{Kir2.3}$ a ninguna de las concentraciones ensayadas, inhibiendo ambas corrientes a concentraciones >20 μ M. La P no aumenta la corriente generada por heterotetrámeros Kir2.1/Kir2.2 o Kir2.1/Kir2.3. Más aún, el aumento de la $I_{Kir2.1}$ es suprimido por la sustitución de la Cys311 por Ala, el residuo presente en la posición equivalente en canales Kir2.2 y Kir2.3. El aumento también se suprime en canales Kir2.1 con mutaciones en los sitios citoplásmicos de unión de poliaminas D255R y E299A. La P aumenta el tiempo medio y la frecuencia de apertura de los canales Kir2.1 y, como consecuencia, la probabilidad de apertura de dichos canales. El bloqueo producido por P no se modifica al aumentar el flujo de K⁺ a través del canal y aumenta en los mutantes D255R y E299A. Los resultados demuestran que, a concentraciones terapéuticas (1 μ M), la P aumenta la $I_{Kir2.1}$ a potenciales de membrana fisiológicos uniéndose al residuo Cys311 lo que aumenta la probabilidad de apertura de los canales. Adicionalmente, la P se une a un sitio de baja afinidad presente en canales Kir2.x que no está en el poro. Estos resultados explicarían que sus efectos proarrítmicos sean específicamente ventriculares.

P.25. Efecto de las dietas grasas en el aprendizaje espacial y en el metabolismo de glutamato en ratones.

Valladolid-Acebes, I., Merino, B., Morales, L., Barbas, C., García, A., Lorenzo, M.P., Fernández-Alfonso, M., del Olmo, N., Cano, V., Ruiz-Gayo, M. Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación. Facultad de Farmacia. Universidad San Pablo-CEU. Madrid. Departamento de Química Analítica y Centro de Excelencia Metabolómica y Bioanálisis (CEMBIO). Facultad de Farmacia. Universidad San Pablo-CEU. Madrid. Instituto Pluridisciplinar-Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.

El glutamato, el neurotransmisor excitador más abundante en el Sistema Nervioso Central, tras su liberación y unión a receptores sinápticos, se recapta por transportadores específicos entre los cuales están el transportador neuronal (EAAT-3) y los transportadores gliales (GLT-1, GLAST). Por otro lado, algunos autores apuntan a que la obesidad provoca el deterioro de determinados tipos de aprendizaje y la memoria, aunque los procesos moleculares que subyacen a este fenómeno permanecen sin esclarecer. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de un tratamiento de 8 semanas con una dieta de alto contenido en grasas (HF; 45% calorías proceden de grasas animales) en i) el aprendizaje y la memoria dependientes de hipocampo y ii) el metabolismo del glutamato en el hipocampo. Para ello, utilizamos ratones C57BL/6 a los que se les administró la dieta HF durante 8 semanas y tras el tratamiento se sometieron a ensayos de aprendizaje espacial en el laberinto radial de 8 brazos (RAM). Con el fin de conocer si estas dietas afectaban a la transmisión glutamatérgica, se calcularon la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la V_{max} de los transportadores de glutamato en el hipocampo así como se identificaron por "western blotting" los transportadores de glutamato GLT-1, GLAST, EAAT-3 y las principales enzimas del metabolismo de este neurotransmisor, la glutamina-sintasa (GS) y la glutamato-decarboxilasas (GAD-65 and GAD-67). Nuestros resultados demuestran que los animales tratados con la dieta HF presentaron dificultades para el aprendizaje una tarea en el RAM ya que tardaron más tiempo y cometieron más errores que los animales control al realizar dicha tarea. Los estudios de la recaptación de glutamato mostraron una disminución en la K_M y un incremento en la V_{max} de los transportadores en los ratones HF. Además, en los animales tratados con dieta HF, los transportadores GLT-1 y GLAST parecen estar regulados al alza, mientras que las enzimas de degradación del glutamato (GS, GAD-65 and GAD-67) están reguladas a la baja. Estos resultados parecen indicar que las 8 semanas de tratamiento con dieta HF dificultan el aprendizaje espacial dependiente de hipocampo a través de inducir alteraciones en el metabolismo del glutamato. Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2009-09714; SAF 2008-02902), la Universidad San Pablo-CEU y la Universidad Complutense de Madrid.

P.26. Estudio de la contracción neurogénica en la arteria femoral de ratas Zucker obesas.

Martínez, A.C., Pagán, R.M., Hernández, M., García-Sacristán, A., Prieto, D., Benedito, S. Sección Departamental de Fisiología Animal. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Las alteraciones asociadas al síndrome metabólico contribuyen en gran medida a la disfunción vascular. El síndrome metabólico no sólo acompaña, sino que precede y predice la diabetes mellitus tipo 2. Entre las complicaciones a largo plazo más frecuentes de este tipo de diabetes se encuentran las neuropatías periféricas. El objetivo de este estudio fue determinar si la respuesta de la arteria femoral a la estimulación eléctrica transmural (EET) se encontraba alterada en un modelo de ratas prediabéticas. Las arterias procedentes de ratas Zucker control y obesas (17-18 semanas) fueron montadas en un miógrafo microvascular para el registro de la tensión isométrica. Se realizaron curvas frecuencia-respuesta de EET. Las contracciones provocadas por EET fueron inhibidas por tetrodotoxina y fenotolamina confirmando su naturaleza neurogénica y adrenérgica. Las contracciones neurogénicas fueron menores en las ratas obesas respecto a las controles. La eliminación mecánica del endotelio desveló la participación de un factor contráctil endotelial que fue de menor magnitud en las ratas obesas. La inhibición de la síntesis de óxido nítrico (NO) con L-NOARG incrementó la respuesta neurogénica tanto en las ratas controles como en las obesas, sin embargo, este efecto únicamente fue dependiente de endotelio en el grupo control. La eliminación de especies reactivas con la enzima superóxido dismutasa (SOD) redujo la vasoconstricción neurogénica exclusivamente en anillos con endotelio de ratas obesas. La participación de un prostanoide contráctil endotelial fue desvelada cuando la indometacina, un inhibidor de la enzima ciclooxigenasa, disminuyó la vasoconstricción inducida por EET en arterias de ratas control pero no de obesas. En conclusión, la menor contracción neurogénica observada en un modelo de ratas prediabéticas podría estar causada por una menor contribución de un factor contráctil endotelial y por una disminución en la síntesis de NO endotelial, que parece derivar en una mayor implicación de radicales libres. Se observa además una participación de NO independiente de endotelio de carácter compensatorio que no existe en ratas controles. Financiado por el proyecto nº SAF2006-09191 y el SAF2009-10448 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

P.27. El nuevo compuesto ITH33 reduce el volumen de infarto cuando se administra después de la isquemia cerebral focal en ratones.

Lorrio, S., Gómez-Rangel, V., Rodríguez, M., Negredo, P., Rodríguez-Franco, M.I., S. Conde, S., Arce, M.P., Villarroya, M., Roda, J.M., López, M.G. Instituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. ²Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Uni-

versitario La Paz (IdiPAZ), Madrid. Instituto de Química Médica (CSIC), Madrid. Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. ⁵Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

El ITH12233 es un compuesto de nueva síntesis, derivado del L-glutamato, sintetizado químicamente como posible tratamiento para las demencias de tipo Alzheimer y vascular. En el compuesto se han aunado tres farmacóforos: N-bencilpiperidina, que inhibe la acetilcolinesterasa (ACE) uniéndose al sitio catalítico; un grupo N-benzoilo que interacciona con el sitio periférico de la ACE, implicado en la agregación de la proteína amiloide β ($A\beta$); y un éster lipofílico para facilitar el paso a través de la barrera hematoencefálica (Arce MP et al, J Med Chem 2009;52:7249-7257). En cultivos celulares de neuroblastoma humano, el compuesto ejerce protección frente a: sobrecarga de calcio, radicales libres, hiperfosforilación de tau y $A\beta$ 1-42. En rodajas de hipocampo de rata sometidas a privación de oxígeno y glucosa, el compuesto protege un 55%. Estos resultados "in vitro" nos animaron a comprobar si el ITH33/IQM9.21 podría inducir neuroprotección en modelos "in vivo" de lesión cerebral. Realizamos experimentos usando el modelo de isquemia cerebral focal por fototrombosis en ratones. El ITH33/IQM9.21 inyectado i.p. 1 h antes de la isquemia redujo significativamente el volumen de infarto a las dosis de 1.25, 2.5 y 5 mg/kg (46, 46 y 45%, respectivamente). En vista de estos resultados realizamos más experimentos administrando el compuesto 1 h después de la isquemia a la dosis de 5 mg/kg. Sacrificamos los ratones 72 h después de la isquemia, realizamos rodajas coronales del cerebro y las teñimos en fresco con TTC para medir el volumen de infarto. El ITH33/IQM9.21 fue capaz de reducir significativamente el volumen de infarto en un 49%. Utilizamos la melatonina como control positivo (Zou LY et al, J Pineal Res 2006;41:150-156), que redujo en un 29% el volumen de infarto cerebral cortical. Creemos que estos resultados demuestran que el ITH33/IQM9.21 es un interesante compuesto con evidente potencial terapéutico neuroprotector en enfermedades cerebrovasculares.

Financiado por proyectos del MICINN SAF2009-12150 (M.G.L.) y SAF2006-03589 (A.G.G.), ISCIII RETICS-RENEVAS-RD06/0026/0009 (A.G.G.), Comunidad Autónoma de Madrid S-SAL-0275/2006 (A.G.G.), Agencia Laín Entralgo NDG07/9 (A.G.G.) y la Fundación Teófilo Hernando.

P.28. Sobreexpresión del receptor cannabinoide 2 (CB2) y excitotoxicidad y neuroinflamación inducidas por estrés.

Zoppi, S. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. UCM. CIBERSAM.

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que los cannabinoides afectan a la ansiedad y la respuesta al estrés. Ha sido demostrada una reducción del receptor CB2 en estriado y hipocampo en modelos animales de depresión. (Onaivi et al., 2008) y un aumento de su expresión ha sido relacionado a procesos de defensa contra el estrés oxidativo (Yiangou et al., 2006), y a la activación de la microglia en procesos neuro-

degenerativos (Ehrhart et al., 2005). La presencia del receptor CB2 en los circuitos neuronales involucrados en la respuesta a estrés sugiere que puede jugar un papel en la regulación neuroendocrina/neuroinflamatoria y en las respuestas comportamentales al estrés. Para aclarar el posible papel del CB2 en la modulación de la excitotoxicidad y neuroinflamación inducidas por estrés por inmovilización, ratones macho adultos transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 (CB2xP) y controles CB1 (WT) fueron expuestos a inmovilización subcrónica y a estrés acústico utilizando un baño de ultrasonidos (2 horas de 13.00h a 15.00h durante 4 días). Los ratones CB2xP estresados presentaron una disminución de iNOS y COX2 y niveles más bajos de malonildialdehído y nitritos comparado con sus respectivos controles. Los posibles mecanismos relacionados son la disminución de la activación de la vía del factor nuclear proinflamatorio kappa B (NFκB) y de las citocinas TNFα y IL-1β. La sobreexpresión del receptor CB2 previno la acumulación de estos mediadores proinflamatorios. Estos resultados demuestran que el receptor CB2 puede tener un papel en la respuesta cerebral a estrés y en los cambios inflamatorios inducidos por éste. Los ratones que sobreexpresan el receptor CB2 presentan un perfil antiinflamatorio en nuestro modelo de estrés subcrónico sugiriendo que este receptor podría ser una diana terapéutica en condiciones donde se presenta neuroinflamación y daño oxidativo.

P.29. Papel de las especies reactivas de oxígeno y los prostanoïdes en las respuestas vasoconstrictoras en ratones infundidos con angiotensina.

Martínez-Revelles, S., Avendaño, M.S., García-Redondo, A.B., García-Redondo, L., Alonso M.J., Briones, A.M., Salices, M. Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

La Angiotensina II (Ang II) está implicada en los procesos patofisiológicos que ocurren en la hipertensión a través de sus acciones proinflamatorias en la pared vascular. La Ang II aumenta la producción de citoquinas y especies reactivas de oxígeno (ERO) e induce la expresión de cicloxigenasa-2 (COX-2) en células musculares. El propósito del estudio fue estudiar el papel de ERO, de los prostanoïdes derivados de COX-2 y del óxido nítrico (NO) en los cambios vasculares observados en aorta de ratones infundidos con Ang II. Se utilizaron los siguientes grupos de ratones C57BL6 (25-35 gr): 1) control; 2) tratados con Ang II (minibomba osmótica subcutánea, 1440 µg/kg/día, 14 días); 3) tratados con Ang II y el inhibidor de COX-2 celecoxib (20 mg/Kg/día). La presión arterial se midió mediante pletismografía de cola. Las respuestas contráctiles y vasodilatadoras de la aorta inducidas por fenilefrina (1 nM-100 µM) y acetilcolina (1 nM-10µM), respectivamente, se analizaron mediante el miógrafo de alambres. La producción "in situ" de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y de NO en aorta de ratón se determinó con la sondas fluorescente hidroetidina (HE) y diamino fluoresceína (DAF) respectivamente. La infusión de Ang II incrementó la presión arterial (95 ± 3.4 vs 146 ± 6.7 mm Hg $p < 0.0001$); dicho aumento fue parcialmente revertido con celecoxib ($121,90 \pm 2.5$ mm Hg $p < 0.0001$). El tra-

tamiento con Ang II aumentó la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina y disminuyó la respuesta relajadora a acetilcolina sin modificar la respuesta vasodilatadora al donador de NO, DEA-NO. El tratamiento con celecoxib revirtió dichos efectos. El inhibidor no selectivo de la sintasa del óxido nítrico L-NAME (100 µM) aumentó la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina más en aortas de ratones controles que en ratones infundidos con Ang II. El tratamiento con celecoxib restauró el efecto potenciador de la respuesta a fenilefrina inducida por L-NAME en ratones infundidos con Ang II. La incubación de los segmentos con apocinina (300 µM), NS 398 (inhibidor de COX-2, 1µM) o SC 560 (inhibidor de COX-1, 1µM), redujo la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina más en ratones infundidos con Ang II que en ratones controles. El tratamiento con celecoxib revirtió tanto el efecto inhibitorio del NS 398 como el de la apocinina (300 µM). El tratamiento con Ang II aumentó la formación de $O_2^{\cdot-}$ y disminuyó la liberación de NO. El tratamiento con celecoxib disminuyó la formación de $O_2^{\cdot-}$ e incrementó la liberación de NO. Nuestros resultados sugieren que: 1) El incremento en la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina inducida por el tratamiento con Ang II está mediado por la producción de ERO y la síntesis de prostanoïdes. 2) El aumento de la producción de ERO en ratones infundidos con Ang II parece reducir la biodisponibilidad del NO y modular la participación de los prostanoïdes en las respuestas vasoconstrictoras. Financiado por MICINN (SAF 2006-02376, SAF 2009-07201), ISCIII (Red RECAVA, RD06/0014/0011) y FMM.

P.30. Cambios inducidos por metanfetamina en la integridad de la barrera hematoencefálica.

Rubio-Araiz, A., Torres, E., Urrutia, A., Gutiérrez-López, M.D., O'Shea, E., Colado, M.I. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

La metanfetamina es una droga de abuso de amplio consumo. Su administración produce una respuesta hipertérmica que parece modular el daño neuronal dopaminérgico, causado por la droga a largo plazo principalmente en la vía nigroestriatal (Krasnova and Cadet, 2009). Por otra parte, la hipertermia *per se* también puede comprometer la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) poniendo en peligro la homeostasia del cerebro (Abbott et al, 2010). El objetivo es evaluar si la administración de metanfetamina en ratones puede alterar la integridad de la BHE tanto de forma estructural como funcional. Ratones C57BL/6J recibieron metanfetamina (4 mg/kg, i.p. una inyección cada 3 horas, 3 veces) y se sacrificaron 1, 3 y 24h después de la última inyección. Mediante western blot se estudiaron las proteínas de la BHE y se examinó la permeabilidad de la misma analizando en el estriado la extravasación de la IgG mediante inmunofluorescencia. En nuestro modelo de administración de metanfetamina observamos un aumento de las proteínas plasmáticas fibronectina y vitronectina 1h después de la última inyección. Por el contrario, cuando se administró la droga a animales mantenidos a 4°C, el aumento de dichas proteínas fue significativamente menor. Sin embargo, no observamos cambios en la expresión de las proteínas estructurales occludina y

claudin-5. Para estudiar la permeabilidad de la BHE cuantificamos la cantidad de inmunoglobulina G extravasada al estriado desde los vasos sanguíneos y observamos un incremento 1h y 3h después de la última inyección. En conjunto estos resultados indican que la metanfetamina altera la permeabilidad de la barrera hematoencefalica, y este efecto es parcialmente dependiente de la respuesta hipertérmica.

Referencias:

1. Abbott NJ, Patabendige A, Dolman D, Yusof SR, Begley DJ. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37, 13–25.
2. Krasnova IN and Cadet JL. 2009. Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Research Reviews*, 60, 379–407.

Financiado por MICINN (SAF2010-21529; RD06/0001/006), PNSD (PR47/10-17826), UCM (910258) y FEDER y RTA.

P.31. BK channels from bovine chromaffin cells influences action potential shape in the absence of Ca²⁺ entry.

Bustillo-Merino, D., Alcides Olivos-Oré, L., Scott, R.S., Cuchillo-Ibañez, I., Barahona, M.V., Carbone, E., Artalejo, A.R. Departamento de Toxicología y Farmacología e Instituto de investigación en Neuroquímica. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Instituto de Neurociencias UMH-CSIC. Campus de San Juan. Sant Joan d'Alacant. Alicante Dipartimento di Neuroscienze. Università degli Studi di Torino. 10125 Torino. Italy.

BK channels modulate cell firing in excitable cells in a voltage-dependent manner regulated by fluctuations in free cytosolic Ca²⁺ during action potentials. Indeed, Ca²⁺-independent BK channel activity has ordinarily been considered not relevant for the physiological behaviour of excitable cells. We employed the patch-clamp technique and selective BK channel blockers to record K⁺ currents from bovine chromaffin cells at minimal intracellular (about 10 nM) and extracellular (free Ca²⁺) Ca²⁺ concentrations. Despite their low open probability under these conditions (V₅₀ of +146.8 mV), BK channels were responsible for more than 25% of the total K⁺ efflux during the first millisecond of a step depolarisation to +20 mV. Moreover, BK channels activated about 30% faster ($\tau = 0.55$ ms) than the rest of available K⁺ channels. The other main source of fast voltage-dependent K⁺ efflux at such a low Ca²⁺ was a transient K⁺ (IA-type) current activating with V₅₀ = -14.2 mV. We also studied the activation of BK currents in response to action potential waveforms and their contribution to shaping action potentials both in the presence and the absence of extracellular Ca²⁺. Our results show that BK channels activate during action potentials and accelerate cell repolarisation even at minimal Ca²⁺ concentration, and suggest that they could do so also in the presence of extracellular Ca²⁺, before Ca²⁺ entering the cell facilitates their activity.

P.32. Estrés oxidativo y remodelado vascular en hipertensión.

García-Redondo, A.B., Roque, F.R., Martínez-Revelles, S., Avendaño, M., Stanescu, C., Fortuño, A., Salices, M., Briones, A.M. Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

Cambios en la estructura de elastina en la vasculatura de resistencia están asociados a un empeoramiento en sus propiedades mecánicas en la hipertensión. El objetivo principal de este estudio ha sido analizar la contribución de especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la incrementada rigidez vascular y las alteraciones en la estructura de la elastina con la hipertensión. Ratas normotensas Wistar Kyoto y espontáneamente hipertensas (SHR) se trataron con: el antagonista del receptor de Angiotensina II (AngII), losartán (15 mg/kg/día, 12 semanas), el antioxidante tempol (1 mM, 17 días), el antioxidante e inhibidor de la NADPH Oxidasa apocinina (2 mmol/l, 17 días) o el análogo de la superóxido dismutasa mitocondrial mito-tempo (0.7 mg/kg, 17 días). Se utilizaron también ratones C57BL6 infundidos o no con AngII (1440 µg/kg/día, 2 semanas) en ausencia o presencia de apocinina o mito-tempo. La presión arterial se midió mediante pletismografía. La estructura y mecánica de las arterias de resistencia se estudió con miografía de presión. La producción de ROS se evaluó mediante fluorescencia inducida por dihidroetidio o quimioluminiscencia por lucigenina. Los resultados indicaron que losartán, pero no tempol, apocinina o mito-tempo, redujo la presión arterial sistólica en SHR. Sin embargo, tanto apocinina como mito-tempo previnieron, en parte, el desarrollo de hipertensión inducida por AngII en ratones. Losartán mejoró la incrementada relación pared:luz en SHR. Ningún antioxidante mejoró este parámetro ni en SHR ni en el modelo de infusión por AngII. Sin embargo, los tratamientos antioxidantes mejoraron el incremento en la rigidez vascular, las alteraciones en la estructura de la elastina, la incrementada producción de ROS y la incrementada activación de la NADPH oxidasa observados en ratas SHR o ratones infundidos con AngII. Resultados similares se encontraron con el tratamiento de ratas SHR con losartán. Estos datos sugieren que el estrés oxidativo inducido por AngII participa en la alteración en la estructura de la elastina y el incremento en la rigidez vascular en hipertensión. Estos efectos de las ROS pueden constituir daño vascular temprano que participaría en el posterior desarrollo de hipertensión.

Financiado por MICINN (RD06/0014/001, SAF-200907201), SEF-Almirall Prodesfarma.

P.33. Efecto de la edad y la pioglitazona sobre células de músculo liso vascular humanas.

Redondo, S., Tejerina, T., Navarro-Dorado, J., Ramajo, M., Alonso, M., Fuster, J.J., Andrés, V. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UCM. Madrid. Servicio de Cirugía General. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular Molecular y Genética. CNIC. Madrid.

En los últimos años se ha demostrado que la edad es un determinante fundamental en la fisiopatología y farmacología vascular. Sin embargo, no se conoce todavía si la edad puede modular la capacidad proliferativa de células de músculo liso vascular humanas. Se obtuvieron células de músculo liso vascular de arteria mesentérica inferior de pacientes sometidos a cirugía abdominal por cáncer de colon, apendicitis aguda, obesidad mórbida o enfermedad inflamatoria intestinal. La proliferación se midió mediante un kit de incorporación de BrdU. La apoptosis se midió mediante un ELISA de fragmentación de DNA. En algunos experimentos, se añadió pioglitazona a 100 μ M. Los resultados indicaron que las células de músculo liso vascular de pacientes de más de 65 años proliferaron menos que las obtenidas de pacientes más jóvenes. En concreto, de una tasa de proliferación de $100 \pm 6.038\%$ en menores de 20 años se pasó a una de $62.49 \pm 8.675\%$ en mayores de 75 años. La pioglitazona no tuvo efectos significativos. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos cuando se midió la apoptosis. Estos datos sugieren que la edad es un importante modulador de la proliferación de células de músculo liso vascular humanas. El efecto de la edad es más acusado que el de la pioglitazona. Este hallazgo puede tener aplicación en el diseño de terapias ajustadas a la edad en los desórdenes vasculares proliferativos. Financiado por FIS PI080920 (Fondo de Investigaciones Sanitarias) y Red Temática de Investigación Cardiovascular RECAVA RD/06/0014/1007 y RD06/0014/0027 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad).

P.34. Efectos de donadores de óxido nítrico sobre corrientes de potasio en miocitos de arterias pulmonares.

Moral-Sanz, J., Barreira, B., Menéndez, C., Moreno, E., Escolano, L., Moreno, L., Cogolludo, A., Pérez-Vizcaino, F. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UCM. Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC). Madrid. Ciber Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Getafe, Madrid. Department of Pediatrics, Maastricht University Medical Center (MUMC+), School for Oncology and Developmental Biology (GROW), Maastricht, the Netherlands.

Los canales K_v7 han sido recientemente implicados en el control del tono vascular pulmonar. Sin embargo, en la actualidad se desconoce la posible modulación de estos canales por mediadores vasoactivos. El objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos de donadores de óxido nítrico (NO) sobre los canales de potasio, en especial K_v7 , presentes en miocitos de arterias pulmonares de resistencia. Se registraron corrientes iónicas en células aisladas frescas de arterias pulmonares (PASM) de resistencia de ratas Wistar macho y de donantes humanos, empleando la técnica de Patch Clamp en su configuración de célula entera. Los donadores de NO, como la dietilamina nonoato (DEA-NO) y el nitroprusiato sódico (NPS) hiperpolarizaron las PASM y produjeron un efecto dual sobre las corrientes nativas, caracterizado por un aumento de la am-

plitud de la corriente a potenciales desde -40 mV hasta -10 mV y una disminución a potenciales más positivos. La flupirtina, fármaco activador de K_v7 , mimetizó ambos efectos. El aumento de corriente generado por los dadores de NO se previno totalmente en presencia de 4-aminopiridina (bloqueante de canales K_v) pero sólo parcialmente por DPO-1, un bloqueante selectivos de canales K_v1 . El aumento de la corriente y la hiperpolarización inducidos por los dadores de NO fueron prevenidos en presencia de los bloqueantes selectivos de canales K_v7 linopirdina y XE-991. Estos efectos se confirmaron en PASM procedentes de tejidos humanos. Finalmente los efectos del DEA-NO no se observaron en condiciones de hipoxia. En conclusión, los canales K_v7 son activados por NO y contribuyen a su acción hiperpolarizante en PASM. Estos datos, resaltan la importancia fisiológica de estos canales en la función arterial pulmonar.

P.35. Effect of the synthetic cannabinoid receptor agonist WIN-55,212-2 on Conditioned Place Preference in Lewis and F344 rats.

Latorre-Canteli, G., Núñez-Carranza, A.E., Coria, S.M., Higuera-Matas, A., Ambrosio, E., García-Lecumberri, C. Departamento de Psicobiología. Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED). Madrid.

Although cannabis is the illicit drug most widely consumed in the world and recent evidence provides support for the existence of a cannabis dependence syndrome in humans, a number of studies have failed to show self-administration behaviour of natural and synthetic cannabinoid compounds in laboratory animals. In a previous work with Lewis (LEW) and Fischer 344(F344) rats -two inbred rat strains that are widely used as an animal model of drug abuse vulnerability, we also found that the synthetic cannabinoid receptor agonist WIN-55,212-2 was not self-administered by these animals. Given that several reports have described that cannabinoid agents induce conditioning in the place preference paradigm (CPP) in outbred rat strains, the aim of the present study was to analyze if administration of WIN-55,212-2 (0.05 mg/kg and 0.5 mg/kg i.p.) to LEW and F344 rats might produce place preference or place aversion in the CPP test. Results show that the dose of 0.5 mg/kg produced similar aversive effects in both rat strains, decreasing the time spent in the drug-paired compartment. These data are in accordance with other reports showing aversive effects of WIN-55,212-2 in a similar rank of doses. In contrast, a dose ten times lower (0.05 mg/kg) did not produce any effect, although a trend to produce aversion to drug-paired compartment was seen in LEW, but not in F344 strain. Taken together, our self-administration and CPP data suggest that the synthetic cannabinoid receptor agonist WIN-55,212-2 has not reinforcing effects in LEW or F344 rats. Supported by Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2007-064890); Ministerio de Sanidad y Consumo (RD06/001/0029, Instituto de Salud Carlos III; Plan Nacional sobre Drogas 2008-2010); Dirección General de Investigación de la Comunidad de Madrid (S-SAL/0261/2006; Consorcio I+D CANNAB-CM); and UNED (Plan de Promoción de la Investigación) Grants.

P.36. Papel de la traslocación bacteriana en la neuroinflamación inducida en un modelo de depresión en rata.

Gárate, I., McDowell, K.S., Zoppi, S., Caso, J.R., Madrigal, J.L.M., García-Bueno, B. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. UCM. CIBERSAM.

Distintos estudios muestran una respuesta inflamatoria/inmune tras la exposición a estrés. Cuando la exposición al estímulo estresante es prolongada en el tiempo o intensa, se ha relacionado con el desarrollo de múltiples enfermedades en distintos sistemas, entre ellos el sistema nervioso, siendo la depresión una de estas patologías altamente relacionadas con el estrés. Se ha podido observar que las personas con depresión tienen alterados distintos parámetros inmunes. Se cree que la traslocación bacteriana observada en pacientes con depresión puede formar parte de la fisiopatología de esta enfermedad. Considerando estos datos intentamos describir el papel de la traslocación bacteriana intestinal (*leaky gut*) en la neuroinflamación inducida en el modelo animal de depresión *Chronic mild stress* (CMS) que consiste en someter a los animales a diferentes agentes estresantes moderados (privación de bebida, inclinación de la jaula, humedecer el serrín, etc.) de manera constante. Hemos sometido a un grupo de ratas adultas SD a 21 días de CMS y medido distintos parámetros neuroinflamatorios en corteza prefrontal. También comprobamos en plasma la traslocación bacteriana con medidas de Lipopolisacárido (LPS) y su proteína plasmática de unión (LBP). Un grupo de animales recibió un protocolo de descontaminación intestinal con antibiótico por vía oral durante los 21 días de CMS. Tras 21 días de CMS los animales presentaron niveles elevados de LPS y LBP plasmáticos lo que indicaba presencia de bacterias Gramnegativas. En corteza prefrontal, la expresión del receptor de LPS, Toll-like receptor 4 (TLR4) y de su co-receptor Mieloid differentiation 2 (MD2) apareció elevada y los distintos parámetros pro-inflamatorios aumentados (COX-2, PGE₂, IL1-β). También, en corteza prefrontal se observó una elevación de MDA, marcador de peroxidación lipídica. Los animales tratados con antibiótico presentaron los mismos niveles que los animales control en los diferentes parámetros inflamatorios anteriormente medidos. Estos resultados sugieren que el tratamiento con antibiótico parece revertir los efectos pro-inflamatorios que se observan tras el CMS.

P.37. El antipsicótico Risperidona normaliza los niveles aumentados de parámetros inflamatorios en un modelo experimental de neuroinflamación.

MacDowell, K.S., Hinojosa, A.E. Madrigal, J.L.M., García-Bueno, B. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. UCM. CIBERSAM.

Aunque la etiología exacta de la esquizofrenia no es del todo conocida, en los últimos años se han presentado varias teorías: alteraciones en el neurodesarrollo, neurodegeneración, anomalías en los neurotransmisores, disfunción inmune o neuro-

inflamación. En la actualidad, el tratamiento estándar consiste en el uso de antipsicóticos, tanto típicos como atípicos (AA: risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol y clozapina entre otros). Sus mecanismos de acción tampoco son del todo conocidos, aunque su principal diana, en el caso particular de uno de los más utilizados, risperidona, son los receptores D₂ y 5HT_{2A}, sobre los que actúa como antagonista, así como cierto bloqueo α adrenérgico. En los últimos años se han presentado ciertos efectos antiinflamatorios y antioxidantes de risperidona (R) y otros AA, sobre todo en modelos *in vitro*. Con el objeto de explorar posibles mecanismos antiinflamatorios de la R en un modelo *in vivo* de neuroinflamación, varios animales (ratas Wistar macho, de 14 sem) recibieron un estímulo inflamatorio, LPS ip (0.5 mg/kg) 30 min. después de la inyección ip de R (0.3 - 3 mg/Kg). Las muestras biológicas se recogieron 90 min después de la administración de R. Ambas dosis de R disminuyen la expresión y el mRNA de iNOS inducida por LPS en cortex cerebral, así como la concentración de NO_x⁻. Igualmente, el aumento de la expresión de COX-2 inducida por LPS es prevenido por R, así como el incremento en la concentración de PGE₂ y de la expresión de la PGE sintasa específica mPGES-1. R previene la acumulación de marcadores de oxidación lipídica en cerebro inducida por LPS. Finalmente, R aumenta los niveles de la PG antiinflamatoria 15 deoxy PGJ₂ y restaura los niveles de la diana de estas PGs antiinflamatorias, el PPARγ (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*). El, pretratamiento con R previene también la acumulación de marcadores oxido/nitrosativos en la periferia (plasma y células nucleadas de sangre periférica). Todos estos datos indican un posible efecto beneficioso alternativo de la risperidona, que podría ser útil en el manejo de cuadros psicóticos en los que se demostrara un aumento de la inflamación.

Publish with iMedPub

<http://www.imedpub.com>

- ✓ "Farmacología y Toxicología" es una revista internacional para la distribución de información científica en español en relación con estas disciplinas, con un énfasis especial en sus frecuentes interrelaciones.
- ✓ Se considerarán para su publicación artículos de investigación originales, revisiones, ensayos, comunicaciones cortas o cartas al editor en cualquiera de los campos de la Farmacología y la Toxicología básica y clínica: molecular, celular, animal, ensayos clínicos, terapéutica, y nuevos métodos y tecnologías en medicina veterinaria y humana.
- ✓ La distribución de la información podrá hacerse bajo la modalidad de libre acceso o de pago, según lo determinen los autores.

Envíe sus artículos aquí:

<http://farmatoxicol.com/>