



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
INGENERÍA BIOMÉDICA

**ACCIÓN DEL SUGAMADEx Y DE
LOS BLOQUEANTES
NEUROMUSCULARES:
ROCURONIO Y VECURONIO EN
NEURONAS EN CULTIVO
PRIMARIO.**

Tesis Doctoral: Juan Campos Campos

Dirigida por:

Dra. Soraya Vallés Martí

Dr. Martín Aldasoro Celaya

Dra. Elena Obrador Plá

VALENCIA: 17 MAYO 2017

Tesis Doctoral

**ACCIÓN DEL SUGAMADEX Y
DE LOS BLOQUEANTES
NEUROMUSCULARES:
ROCURONIO Y VECURONIO EN
NEURONAS EN CULTIVO
PRIMARIO.**

JUAN CAMPOS CAMPOS

INGENERÍA BIOMÉDICA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Directores:

Dra. Soraya Vallés Martí

Dr. Martín Aldasoro Celaya

Dra. Elena Obrador Plá



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Dra. Soraya Vallés Martí, Dr. Martín Aldasoro Celaya y Dra. Elena Obrador Pla, Profesores Titulares del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que **D. Juan Campos Campos**, con DNI: **22630356 N**, ha realizado bajo nuestra dirección la presente **TESIS DOCTORAL**, titulada:

“ACCIÓN DEL SUGAMADEX Y DE LOS BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES: ROCURONIO Y VECURONIO EN NEURONAS EN CULTIVO PRIMARIO”

Para la obtención del título de Doctor y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación.

Valencia, 17 de mayo de 2017

Dra. Soraya Vallés Martí Dr. Martín Aldasoro Celaya Dra. Elena Obrador Plá

D.N.I. 43008486G

D.N.I. 15827704R

D.N.I.18221217L

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme dado la oportunidad de elegir el camino para poder llegar a estar aquí.

A mis hijos, Adrià y Joan, para que vean que con esfuerzo las metas que te propones se pueden conseguir, y les animo a que se preparen para su futuro profesional.

A toda mi familia y a mi hermano Miguel, que desde el primer momento estuvo conmigo.

A todos los niños/as que durante estos años de mi actividad profesional, he podido tener en mis manos, en especial a Sofía.

A mis compañeros de trabajo del Centro de Salud de Nazaret y Facultad por su apoyo en los momentos de dificultades.

En especial a mi directora Dra. Soraya Vallés por facilitarme el haber podido realizar este trabajo, muchas gracias.

A los codirectores Dr. Martín Aldasoro Celaya por sus aportaciones y colaboración prestados y a la Dra. Elena Obrador Plá por su ayuda en la finalización de la tesis, muchas gracias.

Y para todas aquellas personas que he conocido durante esta vida que me han aportado solidaridad y me han ayudado a formarme como ser humano, a todas ellas muchas gracias por compartir momentos de felicidad y de dificultades, un gran abrazo.

Tus manos despiertan mi mente
mueven mi cuerpo y
alegran mi corazón.

Para Da

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 TIPOS DE CÉLULAS EN EL CEREBRO.....	4
1.1.1 NEURONAS	4
1.1.2 CÉLULAS GLIALES.....	15
1.2 BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES (BNM)	25
1.2.1 BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES DESPOLARIZANTES.....	27
1.2.2 BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES NO DESPOLARIZANTES.....	28
1.2.4 ROCURONIO.....	34
1.2.5 VECURONIO.....	37
1.3 SUGAMADEx, DESBLOQUEANTE DE BNMND.....	39
1.4 NEOSTIGMINA.....	45
1.5 NEOSTIGMINA VS SUGAMADEx.....	47
1.6 MUERTE CELULAR.....	50
1.6.1 CITOCROMO C.....	57
1.6.2 FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS (AIF)	58
1.6.3 LA PROTEÍNA SMAC/DIABLO	59
2. HIPÓTESIS.....	61
2. HIPÓTESIS.....	63
3. OBJETIVOS.....	65
3. OBJETIVOS.....	67
4. MATERIAL Y MÉTODO	69
4.1 MATERIALES.....	71
4.1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	71
4.1.2 REACTIVOS.....	72
4.1.3 TIPOS DE ENSAYOS.....	74
4.1.4 TIPOS DE TINCIÓNES	75
4.1.5 OTROS PRODUCTOS.....	75
4.1.6 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.....	79
4.1.7 CULTIVO PRIMARIOS.....	81
4.2 MÉTODO.....	83
4.2.1 INMUNOFLOURESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL	83
4.2.2 ENSAYO DE MTT Y DE LA ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA	83

4.2.3 WESTERN-BLOT	84
4.2.4 ENSAYO TUNEL.....	85
4.2.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3	85
4.2.6 FRACCIONAMIENTO SUB-CELULAR, CUANTIFICACIÓN COLESTEROL.....	85
4.2.7 ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR.....	86
4.3 SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA.....	87
5. RESULTADOS	89
5.1 DIFERENCIAS ENTRE CULTIVOS DE ASTROCITOS Y NEURONAS	91
5.2 SUGAMADEX CAUSA MUERTE NEURONAL.....	92
5.3 MUERTE NEURONAL POR APOPTOSIS Y NECROSIS EN NEURONAS.....	95
5.4 MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR SUGAMADEX.....	96
5.5 APOPTOSIS, SUG Y CAMBIOS EN LOS NIVELES DE COLESTEROL.....	97
5.5.1 COLESTEROL Y MUERTE CELULAR INDUCIDA POR SUGAMADEX	98
5.6 SUGAMADEX Y FACTOR INDUCTOR DE LA APOPTOSIS (AIF)	99
5.7 EFECTO DEL SUG Y SUG+COLESTEROL EN EL CITOCROMO C.....	100
5.8 EXPRESIÓN PROTEICA DE SMAC/DIABLO TRAS DE ADICIÓN DE SUG....	101
5.9 ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3 EN NEURONAS EN CULTIVO PRIMARIO ..	102
5.10 VIABILIDAD CELULAR DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE ROC, VEC Y SUG.	103
5.11 DETERMINACIÓN DE ENZIMA LDH. ACCIÓN DE SUG, ROC Y VEC	104
5.12 NEURONAS INCUBADAS CON SUG, ROC Y VEC CON M.O.	105
5.13 ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3 TRAS ADICIÓN DE ROC, VEC Y SUG.....	107
5.14 EXPRESIÓN DE SMAC/DIABLO EN NEURONAS EN CULTIVO PRIMARIO EN PRESENCIA DE ROC, VEC Y SUG	108
5.15 EXPRESIÓN DE CITOCROMO C EN NEURONAS EN CULTIVO PRIMARIO EN PRESENCIA DE ROC, VEC Y SUG.....	109
5.16 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AIF EN NEURONAS EN CULTIVO TRAS LA ADICIÓN DE ROC, VEC Y SUG.....	110
6. DISCUSIÓN	111
6. DISCUSIÓN.....	113
7. CONCLUSIONES	123
7. CONCLUSIONES	125
8. BIBLIOGRAFIA.....	127
8. BIBLIOGRAFÍA.....	129
9. ANEXOS.....	147
ANEXO I.....	149

ÍNDICE DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

5-HT2A	Receptor de 5-hidroxitriptamina del sistema serotoninérgico
Ac-DEVD-pNAN	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida (sustrato colorimétrico de Casp-3)
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterasa
AIF	Factor inductor de apoptosis (<i>apoptosis inducing factor</i>)
AMPA	Receptor inotrópico de glutamato
AntiAChE	Antagonistas anticolinesterásicos
Anti-AIF	Anti-factor inductor de apoptosis
Anti-Cit c	Anticuerpo monoclonal de la proteína anti-Citocromo c
Anti-GFAP	Anti-proteína ácida fibrilar de la glía
Anti-MAP-2	Anticuerpo monoclonal anti-MAP-2
Apaf1	Factor activador de proteasas apoptóticas
Apo-1	Apolipoproteína 1
Ara-C	Ctosina-β-D-arabinofuranosido
Aβ¹⁻⁴²	Beta-amiloide ¹⁻⁴²
B2M	Beta-2 microglobulina
Bcl-2	B-celula CLL/linfoma 2
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
BNM	Bloqueantes neuromusculares
BNMD	Bloqueantes neuromusculares despolarizantes
BNMND	Bloqueantes neuromusculares no despolarizantes
BP	Barrera placentaria
Casp-3	Caspasa 3
CD95	Receptor de muerte, CD95
ChE	Pseudocolinesterasa
Cit c	Citocromo c
DBS	La doble ráfaga (<i>double burst</i>)
DBS 3.2	La doble ráfaga 3.2

DBS 3.3	La doble ráfaga 3.3
DIABLO	proteína directa de unión a IAP (Direct IAP low pl binding protein)
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco modified Eagle médium)
DNTT	Terminal nucleotidylexotranferase
DR3	Receptor de muerte 3 o Apo-3
DR4	Receptor de muerte 4
DR5	Apo-2 (receptor de muerte 5)
DR6	Receptor de muerte 6
d- UTP	Dioxiuridina trifosfato (<i>deoxyuridine-triphosphate</i>)
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAAT 1-3	Transportador de aminoácidos excitatorios 1-3
ECL	Aumentador de quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Etileno glicol-bis (β -aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetra-ácido acido
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica (<i>amyotrophic lateral sclerosis ALS</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima
EMEA	Agencia Europea del Medicamento
END	Enfermedad neurodegenerativa
FACS	Citometría de flujo
FADD	Proteína asociada a Fas con dominio de muerte (FADD)
FAS	Proteína de asociación de superficie
FDA	Agencia de drogas y alimentos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GABA	Ácido γ -aminobutírico, sistema gabérgico inhibitorio.
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía (<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
GLUT1	Transportador de glucosa 1
GS	Glutamina sintetasa
HCL	Ácido clorhídrico (<i>Hydrochloric acid</i>)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperacina-etanosulfónico

IAP's	Inhibidoras de proteínas apoptóticas
IF	Inmunofluorescencia
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN-γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobina G
IL-1-16	Interleucinas
IL-1β	Interleucina–1 beta
IP	Inmunoprecipitación
LAT1	Transportador de aminoácidos neutros1
LDH	Lactato deshidrogenasa
M1-5	Sub-clasificación de receptores colinérgicos muscarínicos
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófagos-2
MTT	Reducción metabólica-Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol
NAchRs	Receptores nicotínicos colinérgicos
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>nerve growth factor</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NT	Neurotransmisor
NT3, 4, 5	Neurotrofinas 3, 4, 5
p38	Factor tumoral p38
p53	Factor tumoral p53
p75NTR	Receptor de citocinas p75
PAFG	Proteína ácida fibrilar de la glía (<i>GFAP Glial fibrillary acidic protein</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (phosphate buffer saline)
PDL	Poli–D-lisina polímero
P-ERK	Señal extracelular fosforilada-quinasa reguladora
PI	Ioduro de propidio
PTC o RPT	Contaje postetánico (recuento de la estimulación postetánico)
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RNMND	Relajantes neuromusculares no despolarizantes

ROC	Rocuronio
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum FBS</i>)
SMAC	Activador segundo de caspasas derivado de las mitocondrias
SMAC/DIABLO 2º	Activador-caspasas-derivado de mitocondrias / proteína directa de unión a IAP
ST	Estimulo sencillo o único (<i>single twitch</i>)
SUG	Sugamadex
SYN1	Sinapsina 1
t^{1/2}	Vida media
TBST	Tampón salino de tris con polisorbato 20
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal
TeT 50	Estimulación tetánica
Th1	Linfocitos T helper 1
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral
TNF-α	Factor de necrosis tumoral – alfa
TOF	El tren de cuatro (<i>train of four</i>)
TrK	Quinasas relacionadas con la tropomiosina
TUNEL	Deoxinucleotidil transferasa terminal (marcador de final de corte de dUTP)
U18666A	Agente inhibidor del transporte de colesterol
Vd	Volumen de distribución
VEC	Vecuronio
WB	Inmunotransferencia

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Neuronas mediante inmunofluorescencia con Map-2.	4
Figura 2: Tipos de neuronas: monopolar, bipolar y multipolar.	5
Figura 3: Tipos de sinapsis: a) Química y b) Eléctrica.	6
Figura 4: Sinapsis colinérgica neuronal.	7
Figura 5: Acción de los NT por receptores ionotrópicos o metabotrópicos.	9
Figura 6: Receptor-canal de acetilcolina (Ach).	10
Figura 7: Receptor nicotínico de la Ach.	10
Figura 8: Proceso de Neurogénesis en el hipocampo.	13
Figura 9: Tipos de células cerebrales.	15
Figura 10: Astrocitos teñidos con GFAP.	16
Figura 11: Astrocito protoplasmático anti GFAP y astrocito fibroso anti GFAP.	17
Figura 12: Astrocito fibroso, tinción inmunohistoquímica, m. fluorescencia confocal.	17
Figura 13: Astrocitos teñidos con GFAP y Hoechst 33342.	19
Figura 14: Glioblastoma infantil.	19
Figura 15: Astrocitos, neuronas y microglía.	20
Figura 16: Preparación digital de microglía de corteza (cerebelo) teñida NADPasa.	23
Figura 17: citocinas involucrados en la respuesta de inflamación.	23
Figura 18: La placa motora.	25
Figura 19: Mecanismo de acción de los relajantes musculares en la placa motora.	26
Figura 20: Fórmula química del Ach. Figura 21: Fórmula química succinilcolina.	27
Figura 22: Sinapsis de la Placa motora con receptor Ach.	28
Figura 23: Fórmulas químicas del ROC y VEC.	29
Figura 24: Grado de BNM y monitorización TOF y PTC.	32
Figura 25: Fórmula química y estructura 3D de ROC.	34
Figura 26: Estructura del Sugamadex y Estructura química 3D de la γ -ciclodextrina.	39
Figura 27 (a, b, c, d): Estructura espacial 3D de SUG + ROC formando su complejo.	40
Figura 28 a, b: Mecanismo de acción de la Neostigmina y del Sugamadex.	47
Figura 29: Muerte celular por necrosis.	50
Figura 30: Muerte por apoptosis.	51
Figura 31: Secuencia de la muerte celular por necrosis y por apoptosis.	51
Figura 32: Vías de inducción de la apoptosis.	53
Figura 33: Vías múltiples de estrés celular y la apoptosis.	54
Figura 34: Vías de la apoptosis.	56
Figura 35: Detección de proteínas de células neuronales mediante Western Blot.	84
Figura 36 (a, b): Astrocitos en cultivo primario.	91
Figura 37 (a, b): Astrocitos en cultivo primario.	91
Figura 38: Neuronas en cultivo primario.	92
Figura 39: Muerte neuronal inducida por SUG.	93
Figura 40: Imagen campo claro de neuronas a los 10 días de cultivo.	93
Figura 41: Campo claro de neuronas en cultivo primario a 4 días de incubación.	94
Figura 42: Inmunofluorescencia con Hoechst 33342, Anexina V y Rodamina.	95
Figura 43: Efecto del SUG y del SUG + colesterol en la expresión proteica de AIF.	99
Figura 44: Efecto SUG y SUG + colesterol en la expresión proteica del Cit c.	100
Figura 45: Efecto SUG y SUG + colesterol en la expresión proteica del Smac/Diablo.	101

Figura 46: Efecto SUG y SUG + colesterol en la actividad de Casp 3.	102
Figura 47: Viabilidad neuronal (MTT) ante la presencia de ROC, VEC y SUG.	103
Figura 48: Actividad de la LDH en cultivos primarios de neuronas.....	104
Figura 49: Microscopía óptica de neuronas en cultivo primario (10 días de cultivo)...	105
Figura 50: Microscopía óptica de neuronas en cultivo primario (10 días de cultivo)...	105
Figura 51: Microscopía óptica de neuronas en cultivo primario (10 días de cultivo)...	106
Figura 52: Actividad de la Caspasa 3 en neuronas en cultivo primario.....	107
Figura 53: Expresión de la proteína Smac/Diablo en neuronas en cultivo primario....	108
Figura 54: Expresión de la proteína Citocromo c en neuronas en cultivo primario	109
Figura 55: Expresión de la proteína AIF en neuronas en cultivo primario.	110

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Distribución en el cerebro de los diferentes receptores muscarínicos.	11
Tabla 2: Tipos de células gliales.	24
Tabla 3: Tipos de relajantes musculares (RNM).	30
Tabla 4: Resumen de las diferencias entre el VEC y ROC y otros BNMND	36
Tabla 5: Resumen de las diferencias entre el VEC y ROC	38
Tabla 6: Tabla dosis SUG para la reversión con ROC.....	41
Tabla 7: Tabla comparativa en la reversión del BNMND profundo con NEO y SUG....	48
Tabla 8: Tabla comparativa en la reversión del BNM moderado con NEO y SUG.	49
Tabla 9: Tipo de muerte neuronal inducido por SUG	96
Tabla 10: Efecto del Sugamadex.....	97
Tabla 11: Efectos en membrana plasmática.....	98

1 INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cerebro humano se compone de distintos tipos de células, que pueden clasificarse según su apariencia y funcionamiento. Consta de una gran complejidad, a nivel histológico donde su unidad estructural y funcional es la neurona o célula nerviosa, intercalada con elementos de sostén o células gliales.

Las células gliales suponen la mayor parte de las células nerviosas y son necesarias para el funcionamiento normal del cerebro. Su principal función es controlar el ambiente interno del sistema nervioso central (S.N.C) transfiriendo nutrientes de los vasos sanguíneos a las neuronas y eliminando los productos de deshecho y manteniendo así el medio electroquímico adecuado para las neuronas. Las células gliales constituyen aproximadamente el 50% del volumen total del cerebro siendo el origen de la mayoría de los tumores cerebrales, como el glioblastoma y el cáncer de células neuronales no diferenciadas.

Las neuronas están especializadas en recibir información, transmitir impulsos e influir en otras neuronas o tejidos efectores. En el cerebro humano hay alrededor de 100 mil millones de neuronas (Chen & Swanson, 2003; Haines, 2014; Snell, 2007; Squire et al., 2012).

1.1 TIPOS DE CÉLULAS EN EL CEREBRO

1.1.1 NEURONAS

El científico español Santiago Ramón y Cajal (Cajal, 1913) logró describir por primera vez los diferentes tipos de neuronas en forma aislada. Al mismo tiempo planteó que el sistema nervioso estaba constituido por neuronas individuales que se comunicarían entre sí a través de contactos funcionales llamados sinapsis (Teoría neuronal). La hipótesis de Cajal se oponía a la de otros científicos de su época que concebían al sistema nervioso como una amplia red de fibras nerviosas conectadas entre sí formando un continuo (en analogía a los vasos sanguíneos). Consiguió que el científico más prestigioso de su época, Albert von Kölliker, se sentase ante su microscopio en un Congreso en Berlín, para que pudiera comprobar que sus afirmaciones eran ciertas en base a sus preparaciones de tejido nervioso de embrión de pollo. A partir de entonces, al observar el científico alemán que los axones y las dendritas de distintas neuronas no contactaban entre sí, fue universalmente aceptada la propuesta de Cajal y denominada "Doctrina de la neurona", hoy llamada Teoría Neuronal" (Cajal, 1913).

La neurona o célula nerviosa está formada por un soma (cuerpo neuronal o pericarion) de un tamaño aproximado de 5 a 100 micras (Fig. 1) (Kettenmann & Ransom, 2013). Es el centro metabólico que junto con un gran número de mitocondrias refleja el gran consumo de energía y síntesis de proteínas realizadas por la neurona.

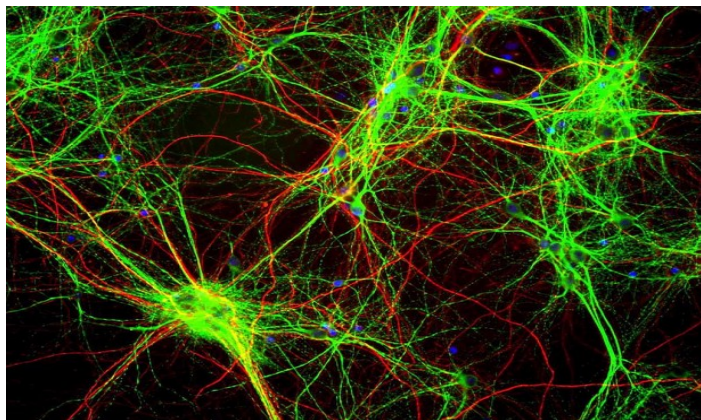


Figura 1: Neuronas mediante inmunofluorescencia con Map-2.

Fuente: <http://blogthinkbig.com/wp-content/uploads/2015/02/neuronas-map2-620x465.jpg>

El núcleo contiene cromatina difusa (eucromatina) y un nucléolo visible. En el citoplasma, los ribosomas son abundantes y el retículo endoplásmico rugoso (RER) es basófilo debido a la gran cantidad de ARN ribosómico unido a su membrana (“*grumos de Nissl*”). El complejo de Golgi está muy desarrollado comparándolo con otros tipos celulares. Del soma parten prolongaciones denominadas dendritas. Suelen ramificarse profusamente en las proximidades del soma adoptando forma arborescente. La información se transmite desde la parte distal a la proximal para confluir en el soma.

Otra prolongación única y de mayor longitud es el axón o cilindroeje. Su citoplasma contiene densos haces de microtúbulos y neurofilamentos que actúan como elementos estructurales y también desempeñan un papel clave en el transporte de metabolitos y orgánulos a lo largo del axón. Las neuronas carecen de ribosomas y los axones terminan en ramas finas llamadas campos terminales, que corresponden a los puntos de contacto funcional o sinapsis.

Las agrupaciones de somas que comparten funciones específicas se denominan núcleos y constituyen la sustancia gris del SNC. La sustancia blanca consta de haces de axones envueltos por una lipoproteína aislante, llamada mielina (Haines, 2014; Snell, 2007; Squire et al, 2012).

Las neuronas se clasifican en tres grandes tipos, en función de la forma del soma y el tipo de prolongaciones que emergen. Estos tipos de células son monopolar, bipolares y multipolares (Fig. 2).

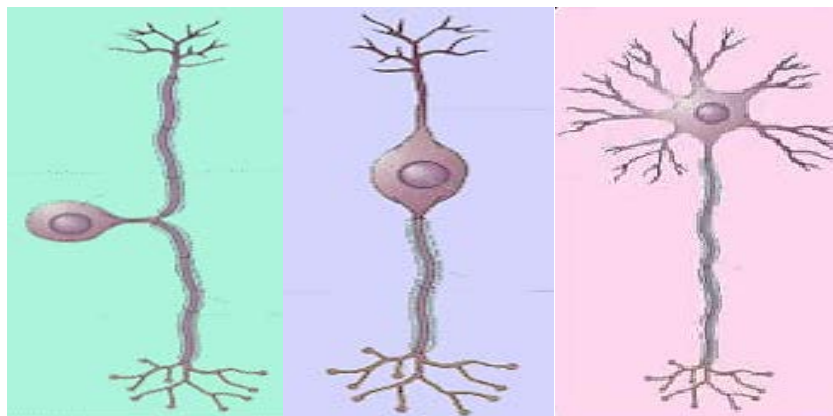


Figura 2: Tipos de neuronas: monopolar, bipolar y multipolar.

Fuente: <http://documents.tips/documents/6-neurona.html>

1.1.1.1 SINAPSIS NEURONAL

La transferencia de información entre una neurona y otra se lleva a cabo en lugares especializados estructural y funcionalmente llamados sinapsis. Es en este lugar donde una prolongación de una neurona (zona terminal del axón) se comunica con una segunda neurona (Fig. 3a) o con una célula efectora (muscular o glandular).

Una sinapsis está integrada por los siguientes elementos: el botón presináptico (botón terminal), que suele formar parte del axón; la hendidura o espacio presináptico (de 20 a 50 nm de anchura); y la región postsináptica (neurona o estructura efectora). Existen dos grandes tipos de sinapsis desde el punto de vista morfológico, las sinapsis químicas y las eléctricas (Fig. 3a y b). En la sinapsis eléctrica hay una conexión que proporciona un puente de baja resistencia entre dos células nerviosas, por medio de proteínas de unión. La información puede fluir en ambos sentidos y no existe retardo sináptico (Fig. 3b). Sin embargo, los canales iónicos no siempre están abiertos y pueden ser modulados por el pH intracelular, por el Ca^{2+} , por segundos mensajeros y por neurotransmisores (Haines, 2014; Snell, 2007; Squire et al, 2012). Las sinapsis más frecuentes en el SNC son las de tipo químico (Fig. 3a) donde la comunicación interneuronal se realiza con la producción y excreción al botón sináptico de mediadores químicos, captados por las neuronas postsinápticas mediante receptores específicos.

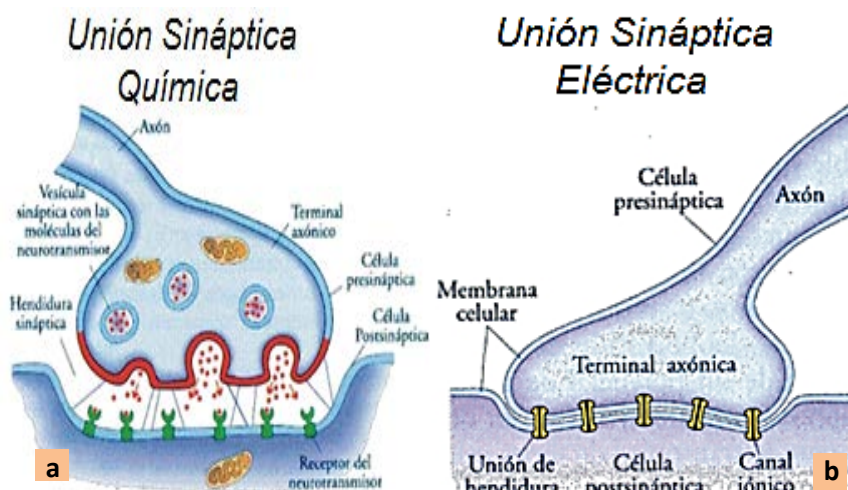


Figura 3: Tipos de sinapsis: a) Química y b) Eléctrica.

Fuente: sites.google.com/site/sinapsiselectricag18c/home

Las neuronas en reposo presentan una determinada carga eléctrica en su interior, diferente a la extracelular. Es el potencial de reposo que normalmente se encuentra en torno a los -70 mV en las neuronas. Con este potencial de reposo las neuronas se encuentran hiperpolarizadas. Si la célula recibe un impulso eléctrico suficiente para superar el umbral se producirá un potencial de acción, es decir, un impulso nervioso que recorrerá el axón permitiendo la liberación del neurotransmisor o neuromodulador (Fig. 4). Estos últimos están almacenados en el botón pre-sináptico en las llamadas vesículas sinápticas y se liberarán al espacio sináptico o hendidura sináptica, mediante la fusión de estas vesículas con la membrana plasmática del axón, en los denominados campos terminales o botones terminales (Haines, 2014; Snell, 2007; Squire et al, 2012; Luján, 2004; Vega Pedrero, 2016).

En el potencial de acción, la carga eléctrica de la neurona se eleva hasta 50 ± 10 mV, lo cual producirá una despolarización de la membrana celular. Posteriormente, el potencial de reposo se mantiene debido a los gradientes químicos, eléctricos y a la acción de la membrana plasmática y las moléculas introducidas en ellas, como la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, que actúa contra gradiente de concentración, introduciendo iones de K^+ en la célula y eliminando al exterior celular iones de Na^+ . Mediante estos mecanismos se mantiene el potencial de reposo de la membrana (Luján, 2004; Vega Pedrero, 2016).

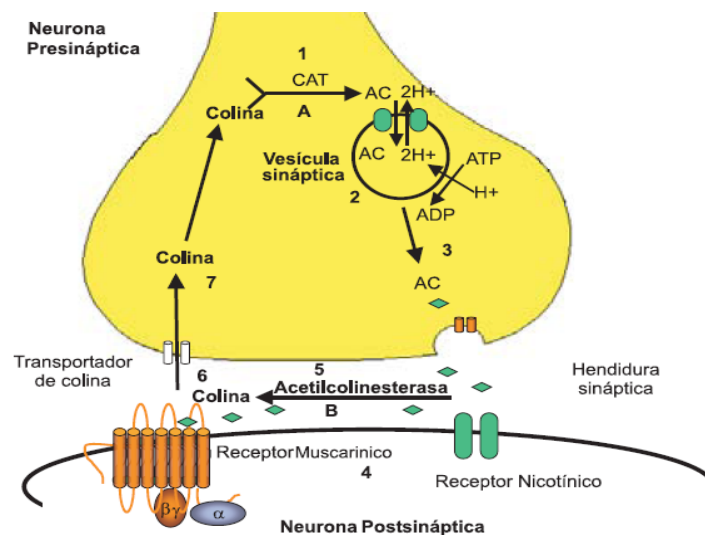


Figura 4: Sinapsis colinérgica neuronal.

Fuente: Flores Soto & JE (2005).

Una vez liberados los neurotransmisores por la célula pre-sináptica deben interactuar con la neurona post-sináptica o con la neurona efectora, para transmitir la información (Fig. 4). La membrana de la neurona post-sináptica contiene receptores con afinidad por el neurotransmisor. La mayoría de los receptores de membrana son cadenas glucoprotéicas que atraviesan la capa lipídica y transforman la señal química extracelular, en un cambio funcional en la neurona (o célula efectora).

Los neurotransmisores son sustancias químicas compuestas de moléculas pequeñas de menos de 10 átomos de carbono y de moléculas grandes, de más de 10 átomos de carbono. Al grupo de pequeñas moléculas pertenecen las aminos-biógenas (acetilcolina, dopamina, noradrenalina); los aminoácidos (GABA, ácido glutámico, glutamato); los nucleótidos (adenosina, ATP); y moléculas grandes como los neuropéptidos (sustancia P, casinina, glucagón, vasopresina, oxitocina).

La inmensa mayoría de la comunicación entre las células del sistema nervioso se realiza por neurotransmisores aminoácidos GABA con efectos predominantemente inhibitorios. Participan en procesos de tipo coordinador o integrador a niveles motores y cognitivos, así como en importantes trastornos neurológicos y psiquiátricos como la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington, la discinesia tardía y los trastornos del sueño.

El neurotransmisor glutamato media en la mayoría de las transmisiones excitatorias. La unión a sus receptores permite el paso de iones de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} produciendo una despolarización de la neurona postsináptica. La liberación y difusión del neurotransmisor desde la terminación presináptica lleva un tiempo, por lo que se dará un retraso sináptico entre la llegada del potencial de acción sináptico y el inicio de la corriente sináptica en la neurona post-sináptica.

En la unión neuromuscular, la liberación presináptica del neurotransmisor de la acetilcolina al espacio sináptico produce un retraso sináptico de unos 50 μs para alcanzar el receptor de la membrana postsináptica (Haines, 2014; Snell, 2007; Squire et al, 2012). Para el neurotransmisor químico de la acetilcolina, el receptor postsináptico es un canal iónico. Son receptores ionotrópicos que se abren cuando un agonista se une a ellos.

La unión provoca la apertura del canal permitiendo el flujo de iones a través de la membrana que permite la entrada de sodio (Na^+) que modificará el potencial de acción (Fig. 5).

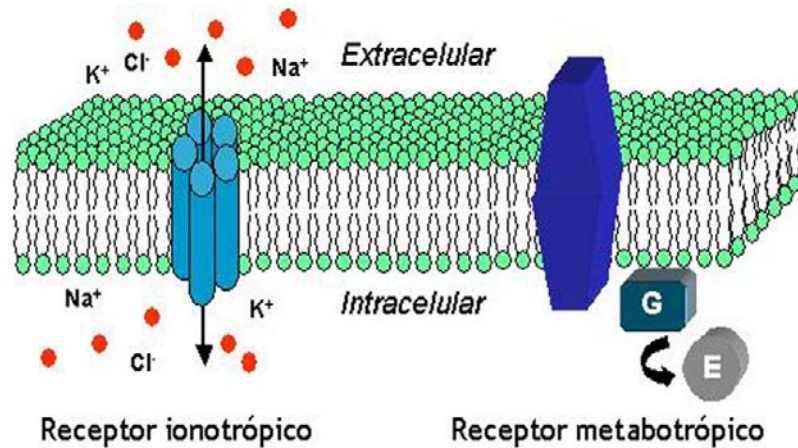


Figura 5: Acción de los NT por receptores ionotrópicos o metabotrópicos.

Fuente: Luján R (2014).

Figura 5. Las acciones de los neurotransmisores están mediadas bien por los receptores ionotrópicos (nicotínicos) o bien por los metabotrópicos (muscarínicos) (7TM). Los primeros forman canales iónicos que permiten el paso de determinados iones (ej. Na^+ , K^+ , Cl^-) a través de la membrana plasmática, mientras que los segundos no abren directamente canales iónicos, sino que están asociados a proteínas G y modulan la actividad de enzimas (E).

Si en un momento dado se provocan cambios en el potencial eléctrico transmembrana que sí supera el umbral, la carga celular llegará a -55 mV , se generará un potencial de acción, los canales iónicos se abrirán y estos permitiendo el paso de cationes de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . La neurona se cargará de iones positivos, y se producirá la despolarización de la neurona post-sináptica (Luján, 2004; Mendoza Patiño, 2008).

A nivel más específico, los receptores se pueden agrupar según el tipo de neurotransmisor químico que los activan (Fig. 6). Se denominan receptores colinérgicos los que responden a la acetilcolina, siendo de dos tipos, nicotínicos y muscarínicos y los llamados receptores adrenérgicos o adrenerreceptores, que serán activados por las catecolaminas (adrenalina o noradrenalina) clasificados en adrenerreceptor α (subtipos: α_{1a} , α_{1b} , α_{1d} , α_{2a} , α_{2b} y α_{2c}) y β (subtipos: β_1 , β_2 , β_3 y β_4).

Los receptores colinérgicos nicotínicos son receptores iónicos que sufren un cambio de estructura cuando son activados por la acetilcolina permitiendo el ingreso

de iones de Na^+ provocado una despolarización de la célula receptora. Se subdivide en receptores N_1 o N_M ubicados en la unión neuromuscular y los N_2 o N_N localizados en el sistema nervioso autónomo (ganglios colinérgicos y adrenérgicos).

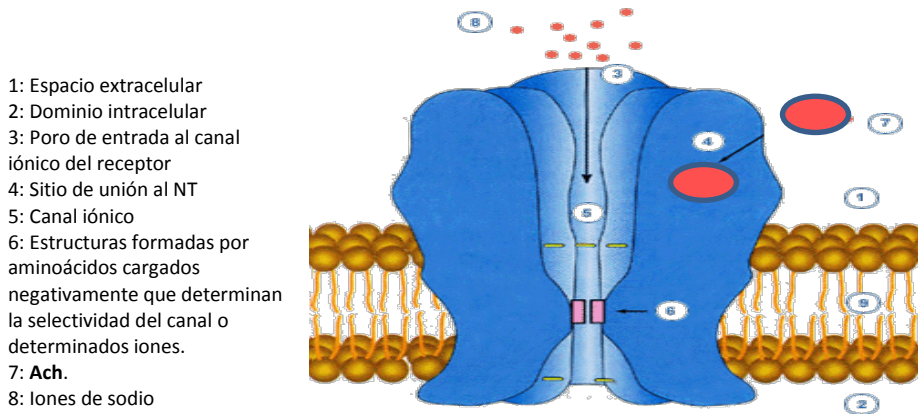


Figura 6: Receptor-canal de acetilcolina (ACh).

Fuente: http://www7.uc.cl/sw_educ/neurociencias/html/083.html

Los receptores que responden al mismo neurotransmisor se clasificarán en subtipos que desencadenarán diferentes respuestas. El receptor nicotínico (nAChRs) es una proteína transmembrana compuesta por cinco subunidades proteicas de canal no homólogas (2α , 1β , 1γ , 1δ) (Fig. 7), y cada una de ellas posee cuatro regiones hidrófobas que atraviesan la membrana. El punto de unión de ACh se encuentra en el núcleo central (ocupando las 2α).

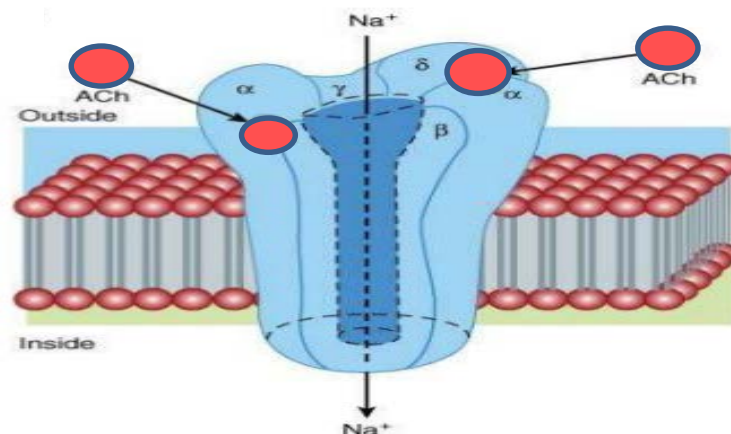


Figura 7: Receptor nicotínico de la ACh.

Fuente: <http://www.slideshare.net/SimbaSyed/skeletal-muscle-relaxants-22389005>

Cuando dos moléculas de Ach se unen a las dos subunidades α se produce un cambio estructural que permite la entrada a favor de gradiente de Na^+ y Ca^{2+} y la salida de K^+ , produciéndose una despolarización parcial que es insuficiente para evocar un potencial de acción en la célula muscular que activa los canales de Na^+ dependientes de voltaje que rodean a la placa motora. Su apertura consigue despolarizar la membrana lo suficiente como para producir un potencial de acción a lo largo de la fibra muscular.

Los receptores colinérgicos muscarínicos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR's) y constituyen la familia más grande de proteínas integrales de membrana. Está formada por una cadena polipeptídica simple con 7 segmentos α -hélice transmembranales que tienen una estructura tridimensional común, son también conocidos como receptores de 7 dominios transmembranales (TM 1-7) o receptores heptahelicoidales. Estos dominios están unidos entre sí por *loops*: 3 intracelulares (iL1-iL3), un *loop* largo compuesto básicamente por aminoácidos hidrofílicos entre las hélices 5 y 6 (iL3), el cuál es el sitio de interacción o acoplamiento a proteína G, 3 *loops* extracelulares (eL1-eL3) y 1 segmento N-terminal glicosilado en el dominio extra celular. Se puede formar un cuarto *loop* en el segmento C-terminal. Se han identificado cinco sub tipos: M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ (Tabla 1) (Levey, 1996. Haines, 2014; Luján, 2004).

Subtipo molecular	Abundancia Regional	Localización Celular	Localización Sináptica
M1	Abundante en cerebro anterior (neo córtex, neo estriado e hipocampo).	Neuronas piramidales y piramidales estriatales.	Post ->> Pre-sináptica
M2	Moderadamente abundante en cerebro.	Neuronas no piramidales en córtex e hipocampo	Pre ->> Post-sináptica
M3	Bajos niveles en todo el cerebro, pero abundante en hipocampo.	Neuronal	Post ->> Pre-sináptica
M4	Abundante en neo estriado, moderados en hipocampo y córtex.	Neuronas estriatales espinosas.	Pre ->> Post-sináptica
M5	Bajos niveles en todo el cerebro.	Neuronas piramidales, materia negra, microglia.	Post ->> Pre-sináptica?

Tabla 1: Distribución en el cerebro de los diferentes receptores muscarínicos.

Fuente: Modificada de Levey, (1996).

1.1.1.2 PLASTICIDAD NEURONAL

La plasticidad cerebral consiste en la adaptación funcional del SNC para minimizar los efectos de las alteraciones estructurales o fisiológicas, la regeneración anatómica o funcional y adaptación a nuevas situaciones que han lesionado el SNC.

Los mecanismos por los que se llevan a cabo los fenómenos de plasticidad son histológicos, bioquímicos y fisiológicos. La plasticidad anatómica de las neuronas es un fenómeno común en la sinapsis, a las que tanto la estimulación fisiológica como las condiciones del entorno darán origen a cambios morfológicos.

La plasticidad del axón es un fenómeno específico que se aprecia después de una lesión y es más pronunciada durante la primera infancia. Así ocurre en niños con parálisis cerebral, donde la lesión del tracto cortico-espinal de un lado puede ser compensada por el tracto contralateral o ipsilateral de los músculos afectados. El mismo fenómeno, aunque en menor cantidad ha podido ser demostrado en épocas muy posteriores a la neonatal, incluso en adultos. La plasticidad axonal y sináptica no tendría utilidad práctica si el ciclo funcional no se completara por la acción de los neurotransmisores específicos. El sistema N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores para glutamato que se concentran en la membrana postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas, está implicado en los mecanismos de facilitación intercortical y en los procesos de aprendizaje y memoria. Su inhibición bloquea la capacidad del córtex cerebral.

Actualmente ya se conoce la clara implicación de los receptores inotrópicos de glutamato (NMDA y AMPA) en procesos patológicos, como la privación de oxígeno (anoxia) en el tejido neuronal produciéndose daño celular isquémico, en las neuronas y en las células gliales con la consiguiente liberación de radicales libres neurotóxicos. Esta disminución de energía afectará al metabolismo celular, a las bombas iónicas y a la capacidad de las neuronas de mantener un potencial de membrana en reposo. Como resultado la despolarización desencadenará potenciales de acción y la posterior liberación de glutamato desde las neuronas pre-sinápticas a la hendidura, activándose los receptores NMDA y AMPA. También a través de los receptores NMDA y de los canales de Ca^{2+} (dependiente de voltaje) se producirá la entrada de Ca^{2+} , lo que desencadenará una cascada de segundos

mensajeros. Las neuronas perderán la capacidad de mantener el potencial de reposo, lo que llevará al daño celular o a la muerte neuronal (Haines, 2014; Luján, 2004).

El tono inhibitorio mediado por el sistema gabaérgico (GABA) es revertido por los cambios neuroquímicos que siguen a la lesión, donde está implicado el glutamato. A nivel farmacológico, la administración de un agente bloqueante (antagonista) del receptor de NMDA protege de los daños al hipocampo y al núcleo estriado, regiones más frecuentemente dañadas por la interrupción del riesgo sanguíneo y la consiguiente anoxia neuronal (Luján, 2004) (Fig. 8).

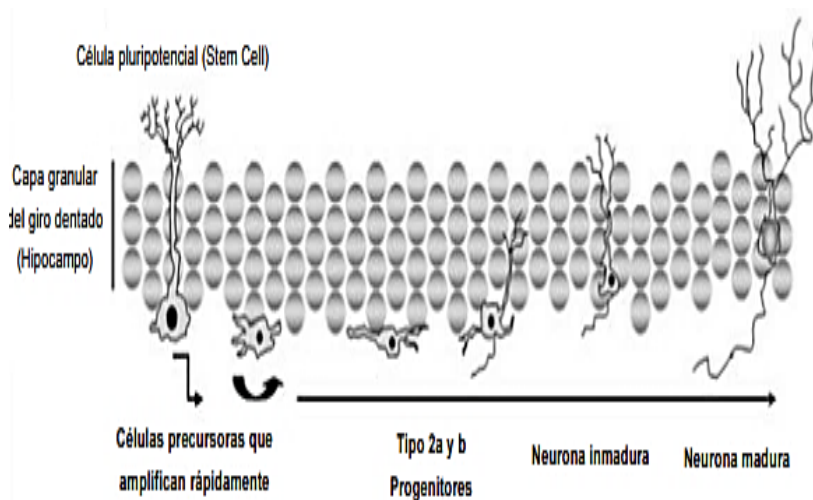


Figura 8: Proceso de Neurogénesis en el hipocampo.

Fuente: Ramírez-Rodríguez, G., Benítez-King, G., & Kempermann, G. (2007).

El sistema colinérgico se relaciona con el sistema glutaminérgico y con la morfogénesis cortical, mientras que el sistema serotoninérgico y concretamente el receptor 5-HT_{2A}, que se expresa en todas las neuronas del córtex, se relaciona con la formación y mantenimiento de nuevas sinapsis. La disminución de los niveles de serotonina y Ach reducen drásticamente el número de sinapsis en la zona del hipocampo (Fig. 8).

La eficacia en la liberación de los neurotransmisores juega un papel importante en la plasticidad sináptica. La sinapsina 1 (SYN1) interviene en la regulación de la exocitosis de las vesículas de los neurotransmisores.

Es una fosfoproteína específica cuya vía de fosforilización es un componente vital en los mecanismos que intervienen en la plasticidad sináptica y contribuyen a la base celular del aprendizaje y de la memoria.

La base fisiopatológica de toda esta recuperación hay que buscarla en la capacidad de la glía dañada para generar señales que faciliten o inhiban el crecimiento axonal y el proceso de proliferación de células madres nerviosas (neurogénesis) que se encuentran en las zonas remanentes de la zona subgranular del hipocampo y las zonas ventricular y periventricular de los ventrículos laterales, adyacentes al núcleo estriado (Hernández-Muela et al., 2004; Pascual-Castroviejo, 1996; Rebolledo, 2003; Ramírez-Rodríguez et al., 2007).

1.1.2 CÉLULAS GLIALES

Las células gliales constituyen una población heterogénea de células no neuronales. A diferencia de las neuronas no propagan potenciales de acción ni sus prolongaciones están especializadas para recibir y transmitir señales eléctricas. Son el soporte estructural y mantienen un microambiente adecuado para la función neuronal. Suponen la mayor parte del sistema nervioso y son necesarias para el funcionamiento del cerebro (Haines, 2014; Nácher Carda, 1995; Cardinali, 1999).

Los tipos fundamentales en el SNC son los astrocitos y los oligodendrocitos (derivados del neuroectodermo) y la microglía, derivado del mesodermo (Fig. 9). (Ndubaku & de Bellard, 2008). La glía y las neuronas pueden producir citocinas proinflamatorias como las interleucinas: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 y IL-16, bajo el efecto de las caspasas inflamatorias. La acción de estas caspasas puede promover la activación de rutas de muerte apoptótica (Fig. 34) (Becerra, 2009; King et al., 2011).

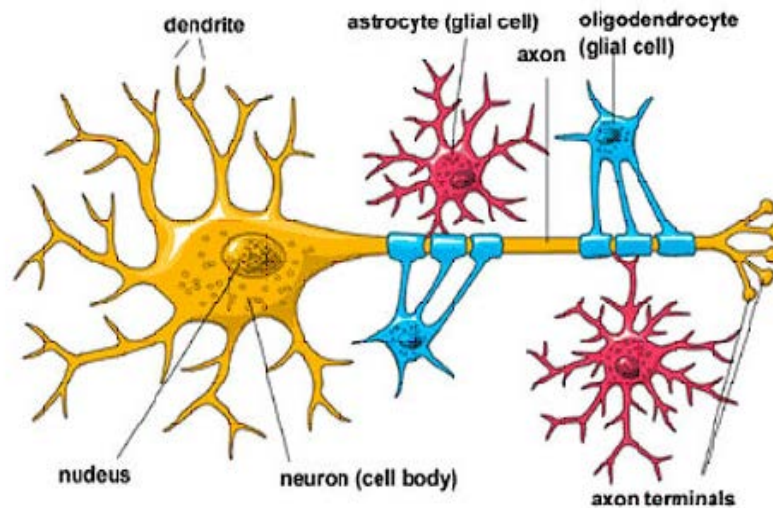


Figura 9: Tipos de células cerebrales.

Fuente: ciencianeural.files.wordpress.com/2015/02/gliales.jpg

1.1.2.1 ASTROCITOS

Son células muy ramificadas y muchas de sus prolongaciones terminan en dilataciones llamadas “*pies astrocíticos*”, se unen para revestir completamente la superficie de contacto entre el SNC y otros tejidos. Cada vaso sanguíneo está cubierto por una capa de “*pies astrocíticos*” peri-vasculares (“*pies chupadores*”) que lo separa del tejido nervioso. (Fig. 9 y 10).

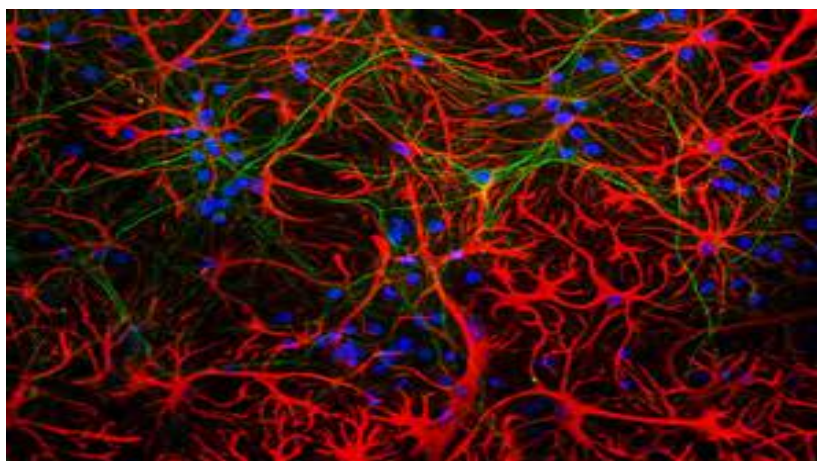


Figura 10: Astrocitos teñidos con GFAP.

Fuente: encorbio.com

Se diferencian dos tipos de astrocitos (Fig. 11a y b), los protoplasmáticos o astrocitos de la sustancia gris, con una simetría radial, y los astrocitos fibrosos (Fig. 12) que contienen filamentos intermedios o prolongaciones que siguen la dirección de los tractos de la sustancia blanca.

Los astrocitos fibrosos se diferencian de los protoplasmáticos por sus canales iónicos, sus receptores de neurotransmisores y su sistema de captación (Haines, 2014; Náchter Carda, 1995; Cardinali, 1999), además expresan GFAP y presentan ramificaciones cortas. Los astrocitos protoplasmáticos presentan procesos más largos y abundantes con formas más complejas y extremadamente elaboradas. No expresan comúnmente niveles detectables de GFAP y se encuentran en contacto con los vasos sanguíneos y con las neuronas adyacentes.

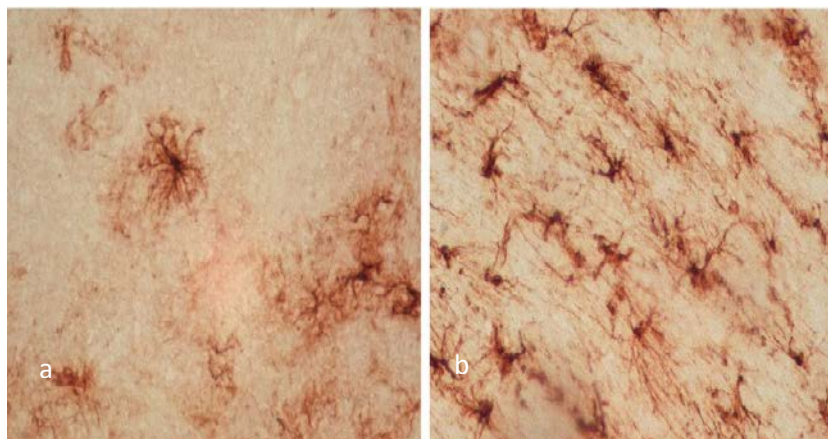


Figura 11: Astrocito protoplasmático anti GFAP y astrocito fibroso anti GFAP.

Fuente: www.wesapiens.org/es/file/5874234454704128/media/0/Astroцитos+Protoplasmáticos+y+Fibrosos+teñidos+con+inmunohistología.

La membrana celular de los astrocitos es permeable en exclusiva al catión de potasio (K^+) que es captado con facilidad principalmente a nivel de los pies vasculares o “podocitos” mediante un mecanismo efectivo de autorregulación de flujo sanguíneo cerebral, impidiendo así una acumulación que dañaría la función neuronal.

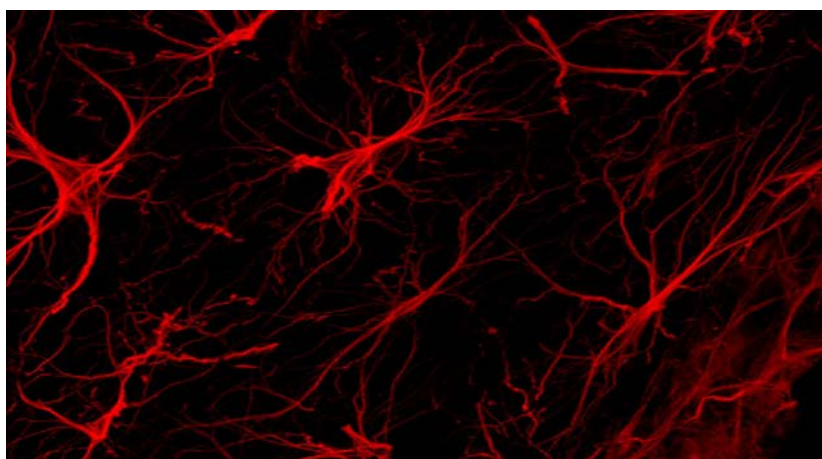


Figura 12: Astrocito fibroso, tinción inmunohistoquímica, m. fluorescencia confocal

Fuente: <http://www.wesapiens.org/es/search/?text=Astrocito+Fibroso>

Los astrocitos están conectados entre sí a través de uniones estrechas formándose entre ellos un amplio sincitio funcional, con posibilidad de perder en una región el K^+ que ha ganado en otra región, lo que se denomina “*buffer espacial of K^+* ” (Cardinali, 1999).

Estas células neurales, participan también en la metabolización de los neurotransmisores. Sus membranas poseen receptores y sustancias neuroactivas y un sistema de captación para otras sustancias, poniendo fin al efecto postsináptico de algunos neurotransmisores al eliminarlos de la hendidura sináptica.

El aminoácido glutamato es captado e inactivado por la enzima glutamina sintetasa, formando la glutamina que es liberada por el astrocito y se convertirá en glutamato en el interior de las neuronas (Fu et al., 2010; Perea & Araque, 2007; Haines, 2014).

Los astrocitos ayudan a establecer y mantener la barrera hematoencefálica (BHE), por medio de las interacciones con las células endoteliales, regulando la expresión y la función de distintos transportadores endoteliales como el transportador de glucosa 1 (GLUT1), el transportador de aminoácidos neutros (LAT1) y el transportador de aminoácidos excitatorios 1-3 (EAAT 1-3) (Abbott et al., 2006).

En procesos patológicos los astrocitos pueden segregar interleucitocinas que regulan la función de las células inmunitarias (Th1 y linfocitos T helper 1) que invaden al SNC, dando lugar a un proceso llamado “*gliosis reactiva*” o “*astrogliosis*”.

Los mediadores químicos como el glutamato, el aspartato, el adenosin trifosfato (ATP), el óxido nítrico (NO), la proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2) el interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) o el caquectina e interleuquina-1beta (IL-1 β), incrementan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), (Ballabh et al., 2004). Este proceso es fundamental para establecer los límites en las áreas dañadas y poder así recuperar la actividad neuronal por medio de la eliminación de cuerpos apoptóticos y tóxicos como el Beta-amiloide (A β 1-42) en la enfermedad de Alzheimer (Gasque et al., 2000; Barnum, 2002; Nguyen et al., 2002; Wyss-Coray & Mucke, 2002).

Para identificar inmunohistoquímicamente los astrocitos existe una proteína marcadora distintiva, que es la proteína ácida fibrilar de la glía (PAFG-GFAP) (Fig. 13) que se verá aumentada en los procesos patológicos (Eddleston & Mucke, 1993; Giaume, 2009; Haines, 2014).

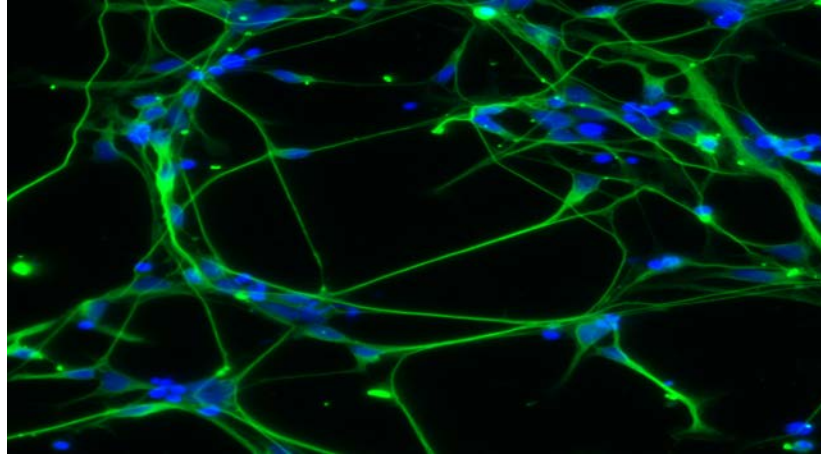


Figura 13: Astrocitos teñidos con GFAP y Hoechst 33342.

Fuente: <http://arunabiomedical.com/index.php?id=26&productid=19>

En el cerebro adulto los astrocitos conservan la capacidad de proliferación, siendo sensibles a los acontecimientos que alteran el control de la división celular, explicando por qué la mayoría de los tumores del SNC son de origen astrocítico, astrocitoma y glioblastomas (Fig. 14) (Haines, 2014).

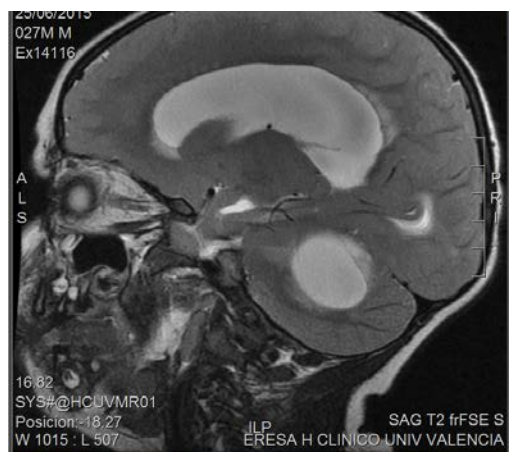


Figura 14: Glioblastoma infantil.

Fuente: Hospital Clínico Universitario de Valencia

Los primeros hallazgos realizados por Altman y Das en la década de 1970 (Das & Altman, 1970) indicaron la formación de nuevas neuronas (neurogénesis) y fue cuando se cuantificó la incorporación de la timidina tritiada en el hipocampo, en dos regiones específicas; la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado (Ramírez-Rodríguez et al., 2007; Gould et al., 1992; Eriksson, Perfilieva, Björk-Eriksson et al., 1998; Sanai et al., 2004).

Las células pluripotenciales, los astrocitos y las células endoteliales son componentes del nicho celular, un micro-ambiente especializado que interviene en la regulación de la neurogénesis (Ramírez-Rodríguez et al., 2007).

Los astrocitos modulan la proliferación de las células pluripotenciales (Fig. 15) y la migración de estas células a través de la acción de diversos factores de crecimiento o neurotrofinas (neurotróficos) siendo su función impedir que las neuronas inicien la muerte celular programada por apoptosis, como describió Levi-Montalcini en 1951. (Fig. 29 y 30)

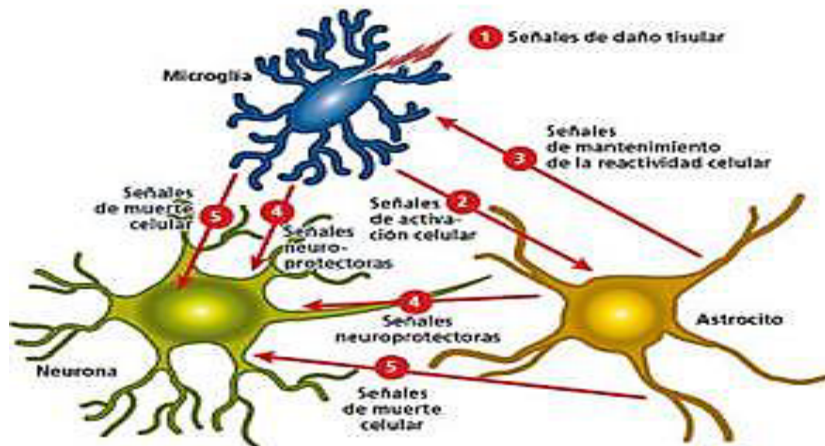


Figura 15: Astrocitos, neuronas y microglía.

Fuente: Fernández & Torres (2012)

Las neurotrofinas se unirán a dos tipos de receptores: las tirosina quinasas, los TrK (tropomyosin-related kinase, TrkA, TrkB, TrkC) y al receptor p75NTR (receptor de citocinas) relacionado con el TNF (Lorigados-Pedre & Bergado-Rosado, 2004). Las neurotrofinas más destacadas son: el factor de crecimiento neural (NGF, nerve growth factor), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, brain-derived

neurotrophic factor) estimulador de la neurogénesis con una función importante en el desarrollo neurológico normal, las neurotrofinas (NT-3,NT-4,NT-5) y específicamente el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor) (Song et al., 2002) que participan ayudando a estimular y controlar la neurogénesis debido a sus propiedades de neuroprotección (Haines, 2014; Ramírez-Rodríguez et al. 2007). Por otra parte, se ha demostrado la existencia de astrocitos, GFAP positivos, (del Moral, 1993) con características de células madre que pueden generar precursores neuronales (Azizi & Krynska., 2013).

En conjunto, todos los estudios apoyan la hipótesis de que los astrocitos, más allá de su papel de soporte a las neuronas, poseen un papel importante en la regulación de la neurogénesis y de los procesos sinápticos, incluida la transmisión sináptica (Parpura et al., 2012; Dodla et al., 2010; Guillamón-Vivancos et al., 2013; Ramírez-Rodríguez et al. 2007).

En enfermedades neurodegenerativas (END), como por ejemplo Alzheimer (EA) o Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), en situaciones de estrés, depresión y la falta de sueño, hay evidencias de que la neurogénesis disminuye y de que los factores neurotróficos van a prevenir la atrofia y la muerte neuronal durante el desarrollo y la vida adulta (Ramírez-Rodríguez et al. 2007).

1.1.2.2 OLIGODENDROCITOS

Los oligodendrocitos son las células encargadas de producir y mantener la mielinización axonal en el SNC, similar a las células de Schwann en los nervios periféricos y se reparten tanto por la sustancia gris como por la blanca (Cajal, 1913; del Río-Hortega, 1928; Bradford, 1988; Ndubaku & de Bellard, 2008). Son más pequeños que los astrocitos y sus núcleos son irregulares y densamente teñidos, el citoplasma contiene un extenso aparato de Golgi, muchas mitocondrias y gran número de microtúbulos.

En la sustancia gris se sitúan junto a los somas neuronales y los rodean, extendiéndose desde el segmento inicial del axón hasta la rama terminal. En la sustancia blanca la vaina rodea a algunos axones para aislarlos electroquímicamente. Esta vaina no es continua a lo largo de toda su longitud y sus interrupciones se denominan “*nódulos de Ranvier*”. Los segmentos entre los nódulos adyacentes se llaman “*segmentos internodulares o internódulos*”. La vaina de mielina produce un aumento de velocidad de conducción de los potenciales de acción en la transmisión nerviosa. La pérdida de mielina ocasiona la disminución de la velocidad de conducción y de propagación del potencial de acción en estos axones (Haines, 2014). Expresan receptores de glutamato y presentan baja resistencia a procesos de estrés oxidativo, lo cual les hace más susceptibles a procesos de apoptosis y necrosis (Matute et al., 2007). Los axones desmielinizados sobreviven algún tiempo, y es posible que se produzca un grado de remielinización gracias al crecimiento de células precursoras de oligodendrocitos, la liberación de factores tróficos para neuronas y astrocitos (Barres et al., 1992; Gard et al., 1995; Fernández et al., 2000; Haines, 2014).

El daño de estas células conlleva a la lesión o muerte en enfermedades desmielinizantes y neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer o ELA (McDonald et al., 2001; Compston & Coles, 2008; Losy, 2013).

1.1.2.3 MICROGLÍA

Los microglíocitos son las células inmunitarias efectoras o macrófagos del SNC (Fig. 16). Al igual que los macrófagos, las células microgliales tiene la capacidad de convertirse en fagocitos y ante una lesión, son activados emigrando a la zona dañada donde proliferan y fagocitan los residuos celulares (del Rio-Hortega, 1932; Davoust et al., 2008; Haines, 2014).



Figura 16: Preparación digital de microglía de corteza (cerebelo) teñida NADPasa.

Fuente: www.wesapiens.org/es/file/14893002/Microglia%2C+T%C3%A9cnica+de+la+NADPasa

Las principales citocinas que actúan en respuesta a la inflamación, como son la citocina IL-1 β , el factor de necrosis tumoral (TNF- α), otras citocinas y las prostaglandinas también son segregadas por los microglíocitos activos (Fig. 17).

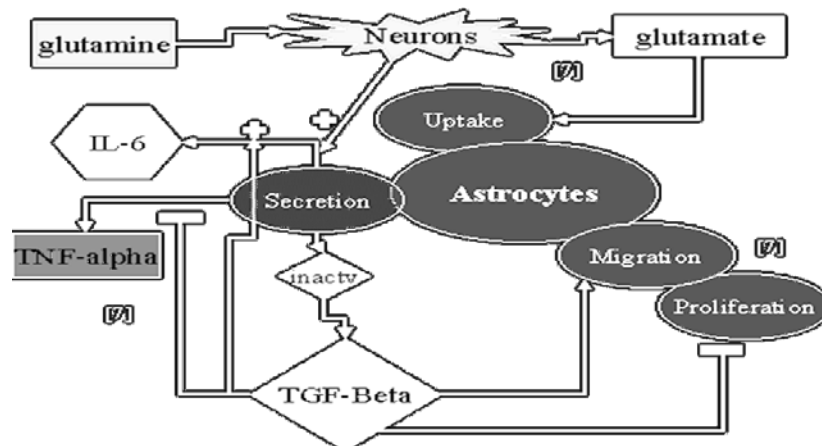


Figura 17: citocinas involucrados en la respuesta de inflamación.

Fuente: <https://www.withfriendship.com/user/mithunss/tumor-necrosis-factor-alpha.php>

Algunas de las moléculas liberadas son neurotóxicas (glutamato y radicales de oxígeno). La excesiva secreción de IL-1 β y TNF- α inducen a las células endoteliales a abrir la barrera hematoencefálica (BHE), permitiendo así la inflamación leucocítica del parénquima cerebral, como ocurre en la meningitis bacteriana (Haines, 2014) (Tabla 2).

TIPO DE CÉLULA	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
ASTROCITOS	Todo SNC, en contacto con somas, dendritas y axones. Revestimiento alrededor de los vasos sanguíneos.	Mantener el entorno iónico extracelular, apoyo estructural y metabólico a las neuronas, intervención en la memoria y aprendizaje.
OLIGODENDROCITOS	Forman la vaina de mielina alrededor de los axones y rodean a los somas neuronales.	Mielinización.
MICROGLÍA	Sustancia gris y blanca.	Eliminación y fagocitosis de los residuos después de una lesión y muerte celular. Secreción de citocinas.

Tabla 2: Tipos de células gliales.

1.2 BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES (BNM)

La actividad musculo-esquelética puede bloquearse por fármacos que actúan a nivel del SNC y de la unión neuromuscular. Los bloqueantes neuromusculares (BNM) son los fármacos que actúan a nivel de la placa motora (unión o sinapsis neuromuscular) (Fig. 18). Fue al final del siglo XIX cuando Claude Bernat descubrió el mecanismo de acción del curare introduciendo el concepto de la transmisión neuromuscular.

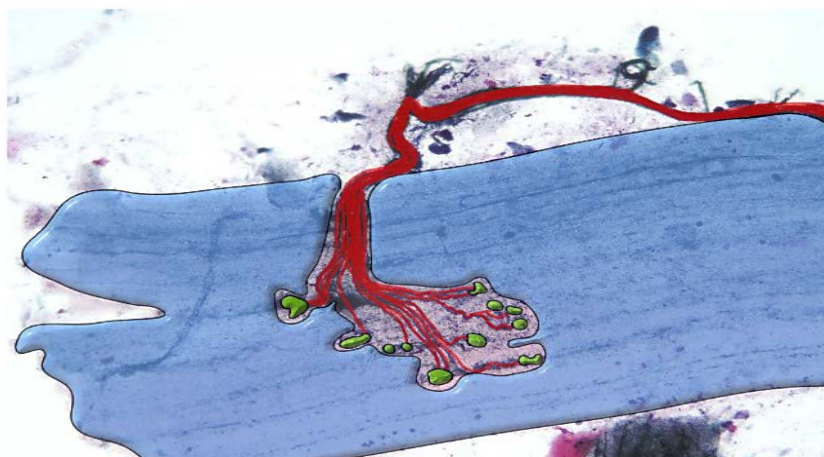


Figura 18: La placa motora.

Fuente: www.wesapiens.org/es/file/197140/Placa+motora

Figura 18: La placa motora o unión neuromuscular es la sinapsis o unión del terminal axónico de una neurona motora con la membrana de la fibra muscular altamente excitable, responsable de la iniciación de los potenciales de acción a través de la superficie del músculo, causando la contracción muscular. El neurotransmisor Ach pasa a través de la unión neuromuscular mediante el neurotransmisor acetilcolina.

En la fisiología de la unión neuromuscular es básico recordar que los impulsos nerviosos que alcanzan las terminaciones nerviosas producen liberación de acetilcolina, que actúa en la placa motora o sinapsis neuromuscular. Se une a receptores específicos ubicados en la membrana de la fibra muscular, que presenta unas invaginaciones que se denominan pliegues de unión o sinápticos (Fig. 3a y 4). En las crestas de estas invaginaciones es donde se localizan los receptores colinérgicos de alta densidad (sustipo N_1) (Fig.7).

La unión Ach-receptor produce un cambio conformacional que permite el flujo de iones a favor de sus correspondientes gradientes electroquímicos.

Debido a que la fuerza de conducción para el Na^+ es mucho mayor que para el K^+ , predomina la corriente de entrada de Na^+ , produciéndose una despolarización local de la placa motora llamada potencial de placa motora que se traduce en una contracción muscular (Fig. 7 y 19).

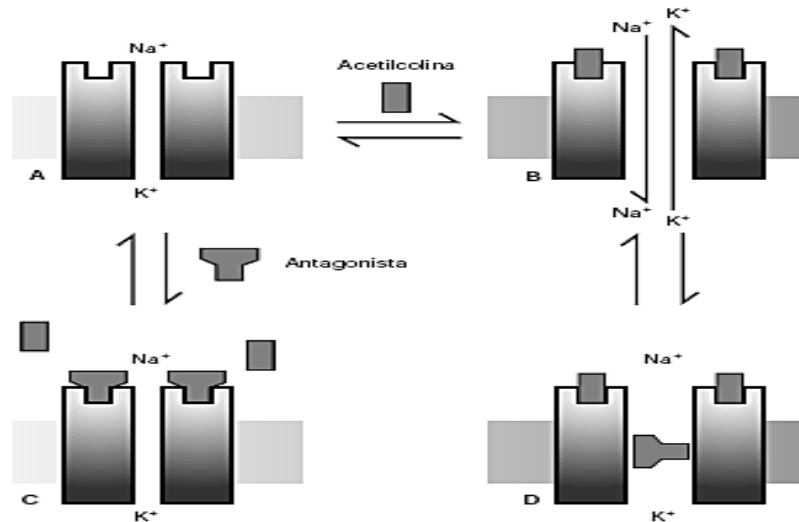


Figura 19: Mecanismo de acción de los relajantes musculares en la placa motora.

Fuente: <http://es.slideshare.net/OswaldoAngeles/agonistas-y-antagonistas-colinrgicos>

La restauración del tono o repolarización se produce por una combinación entre la recaptación de acetilcolina y su degradación por parte de la enzima específica ubicada en la placa motora, la acetilcolinesterasa que la desdobla en acetato y colina (Fig. 4). La colina será recaptada por el terminal presináptico y el acetato difunde hacia el líquido extracelular (Merino Pérez & Noriega Borge, 2010).

Otra enzima inespecífica que metaboliza la acetilcolina y las moléculas similares circulantes en el plasma es la enzima pseudocolinesterasa la cual no está presente en la unión neuromuscular (Bowman, 1998; Amorós et al., 2000).

Los BNMs actúan compitiendo activamente con los receptores de la acetilcolina en la unión neuromuscular, son los despolarizantes (BNMD) (agonistas de la acetilcolina), o bien bloqueando los receptores de acetilcolina sin activarlos (antagonistas de la acetilcolina) denominados bloqueantes no despolarizantes (BNMND) (Fig. 19).

1.2.1 BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES DESPOLARIZANTES

Se asemejan químicamente a la acetilcolina, y actúan imitando la acción despolarizante de la acetilcolina (Fig. 20). Son agonistas de larga duración de la enzima acetilcolina que se unen a los receptores nicotínicos colinérgicos despolarizando la unión neuromuscular de la placa motora, En la actualidad la succinilcolina (suxametonio) es el único que se utiliza como BNMD (Fig. 21).

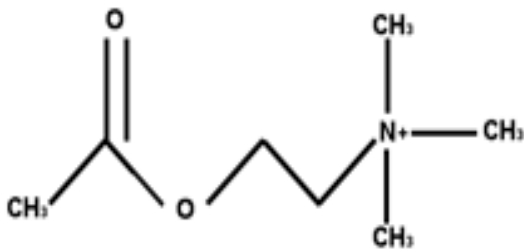


Figura 20: Fórmula química del Ach.

Fuente: Flores Soto, & Je, (2005).

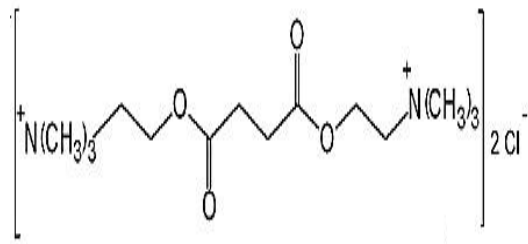


Figura 21: Fórmula química succinilcolina.

Fuente: www.iqb.es/diccio/s/su.htm#succinilcolina

A diferencia de la acetilcolina, el BNMD no es metabolizado en la unión neuromuscular por la enzima acetilcolinesterasa, por lo que ocurre una despolarización prolongada que evita la contracción muscular hasta que la terminación motora sea repolarizada. Esta repolarización no puede producirse hasta que el relajante muscular difunda fuera de la hendidura sináptica (Gómez et al., 2000). A medida que los BNMD se difunden, son metabolizados por la enzima colinesterasa plasmática o pseudocolinesterasa. También los BNMD pueden producir despolarización de los receptores presinápticos de la placa motora que producirá una excesiva estimulación nerviosa. Clínicamente se producen fasciculaciones musculares que preceden al inicio de las mialgias postoperatorias. La activación de receptores extraunionales produce un aumento de la liberación de K^+ , y de los receptores muscarínicos (M1-M5) que producen otros efectos secundarios (Bozzo, 2004).

1.2.2 BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES NO DESPOLARIZANTES

Actúan compitiendo con la acetilcolina en los sitios de unión ubicados en las dos subunidades alfa (α) de los receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs) (Jérez-Escobar & Martínez-Visbal, 2015; Flores Soto & Je, 2005) (Fig. 7), a nivel postsináptico pero también en el presináptico. Son antagonistas anticolinesterásicos como neostigmina y edrofonio (Yonfa, 2006), que forman un complejo con la acetilcolinesterasa impidiendo la despolarización de los receptores de la placa motora, provocando una parálisis flácida, sin producir fasciculaciones musculares. La acetilcolina liberada en la terminación nerviosa se une a las dos subunidades alfa (α) provocando que los canales iónicos se abran (Oswaldo, 2012). El efecto de los BNMND es reducir o abolir la frecuencia de la apertura de los canales iónicos. Es suficiente que una de las dos subunidades (α) esté ocupada por una molécula de BNMND para que el receptor sea bloqueado (Fig. 6 y 7).

Para que exista un bloqueo clínico es necesario que más del 80% del total de los receptores este ocupado, por lo que existe un gran margen de seguridad respecto al número de receptores que deben ser bloqueados dando lugar a la relajación (Waud & Waud, 1972) (Fig. 22).

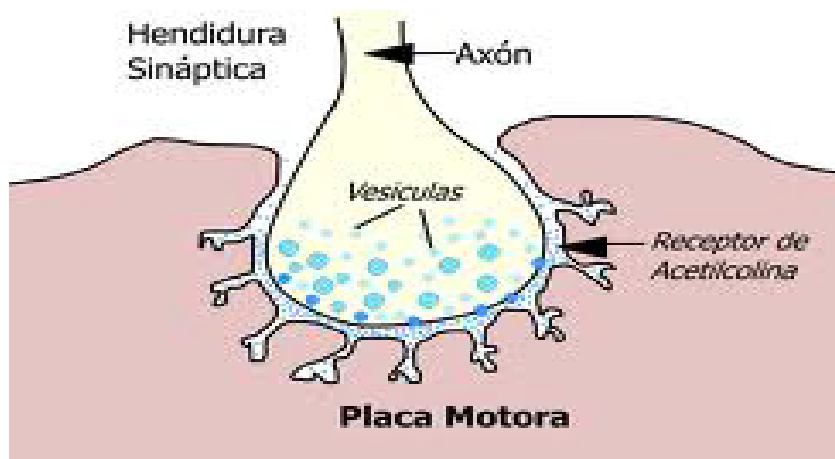


Figura 22: Sinapsis de la Placa motora con receptor Ach.

Fuente: <https://residenciasalcalamahora.wordpress.com/tag/contraccion-muscular/>

El papel de los receptores nicotínicos colinérgicos presinápticos es permitir acelerar la movilización de las vesículas de acetilcolina desde el depósito de reserva hacia la hendidura sináptica (Fig. 22), como efecto de la retroalimentación positiva para mantener la liberación de la acetilcolina (Katz, 1967).

Los BNMND al unirse a los receptores presinápticos disminuyen la liberación de la acetilcolina presináptica, lo que produce una fatiga o disminución de la respuesta a la estimulación tetánica; y al unirse a los postsinápticos, previenen la despolarización de la membrana postsináptica lo que produce una relajación muscular (Bowman, 1980).

Una característica común a todos los relajantes musculares es la presencia de uno, dos o tres nitrógenos cuaternarios que le dan una carga iónica positiva. Las bencilisoquinolinas (excepto la d-turbocurarina), el pancuronio y el pipecuronio son compuestos bi-cuaternarios. El vecuronio y rocuronio (Fig. 23) tienen un solo nitrógeno cuaternario "in vitro" pero se transforma en compuestos bi-cuaternarios en condiciones fisiológicas (Bozzo, 2007) (Tabla 2).

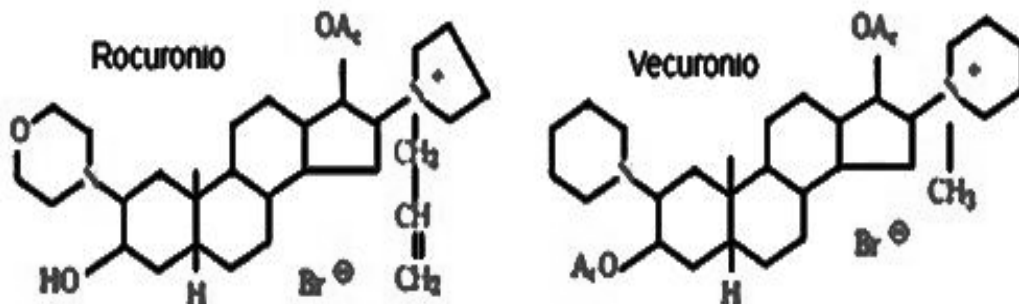


Figura 23: Fórmula químicas del ROC y VEC.

Fuente: Cordero Escobar, (2010)

La tabla 3, muestra los tipos de relajantes musculares y sus diferencias, donde rocuronio y vecuronio, que junto con el pancuronio, pipecuronio y rapacuronio, se encuentran entre los RNM del tipo BNMND que son no despolarizantes y aminoesteroides.

Otros fármacos son los despolarizantes como el suxametonio con el tipo succinilcolina y los no despolarizantes como las bencilisoquinolinas. Dentro de estas últimas tenemos de los tipos atracurio, cisatracurio, doxacurio, mivacurio y d-tubocurarina. Todos estos fármacos han sido usados en menor o mayor medida, siendo el rocuronio y el vecuronio, los que analizaremos en esta tesis.

BNM	FARMACOS	TIPOS
DESPOLARIZANTES (BNMD)	SUXAMETONIO	SUCCINILCOLINA
NO DESPOLARIZANTES (BNMND)	BENCILISOQUINOLINAS	ATRACURIO CISATRACURIO DOXACURIO MIVACURIO d-TUBOCURARINA
NO DESPOLARIZANTES (BNMND)	AMINOESTEROIDEOS	PANCURONIO VECURONIO ROCURONIO PIPECURONIO RAPACURONIO

Tabla 3: Tipos de relajantes musculares (RNM).

1.2.3 MONITORIZACIÓN EN EL BLOQUEO NEURO MUSCULAR

Se emplean diferentes métodos clínicos o instrumentales para la monitorización del BNM. Los métodos clínicos están basados en la detección visual de los músculos y los instrumentales en la estimulación eléctrica de un nervio motor periférico y la detección subjetiva, visual o táctil, u objetiva de la respuesta contráctil del músculo inervado.

Los métodos de estimulación eléctrica recomendados serán: el tren de cuatro (“*train of four*” TOF), el conteo postetánico (PTC o RPT “*recuento de la estimulación postetánico*”), la doble ráfaga (DBS), estímulo sencillo o único (“*single twitch*” ST) y la estimulación tetánica (TeT50). En la práctica clínica la monitorización neuromuscular se aplica principalmente mediante el TOF, el PTC y el DBS.

1.2.3.1 EL TREN DE CUATRO (TRAIN OF FOUR)

Introducido en el 1968 por Wilson y Roberts, consiste en la aplicación de cuatro estímulos eléctricos supra máximos con un intervalo de 0.5 s y con una intensidad de 2 Hz en 2 s. Se evalúa dividiendo la amplitud de la cuarta respuesta entre la amplitud de la primera, obteniéndose el coeficiente TOF de T_4/T_1 . La relación entre la cuarta y la primera respuesta se llama relación del tren de cuatro (TOF-ratio). (Antuña et al., 2000).

En ausencia del BNM se obtienen cuatro contracciones iguales en el músculo dependiente del nervio estimulado, el nervio cubital, y se observa la respuesta motora del músculo adductor del pulgar. En el BNMND la intensidad y el número de respuestas obtenidas son inversamente proporcionales a la profundidad del bloqueo (Fig. 24).

La cuarta respuesta (T_4) desaparece cuando la ocupación de los receptores nicotínicos es de alrededor del 75%, la tercera (T_3) a 80-85%, la segunda (T_2) a 85-90% y no hay respuesta (T_1) cuando se han ocupado entre el 90 y 100% de los receptores.

La estimulación se puede repetir periódicamente siempre y cuando se respete un intervalo entre estímulos entre 10 y 20 segundos (Chamorro et al., 2008; Ariño-lrujo et al., 2010).

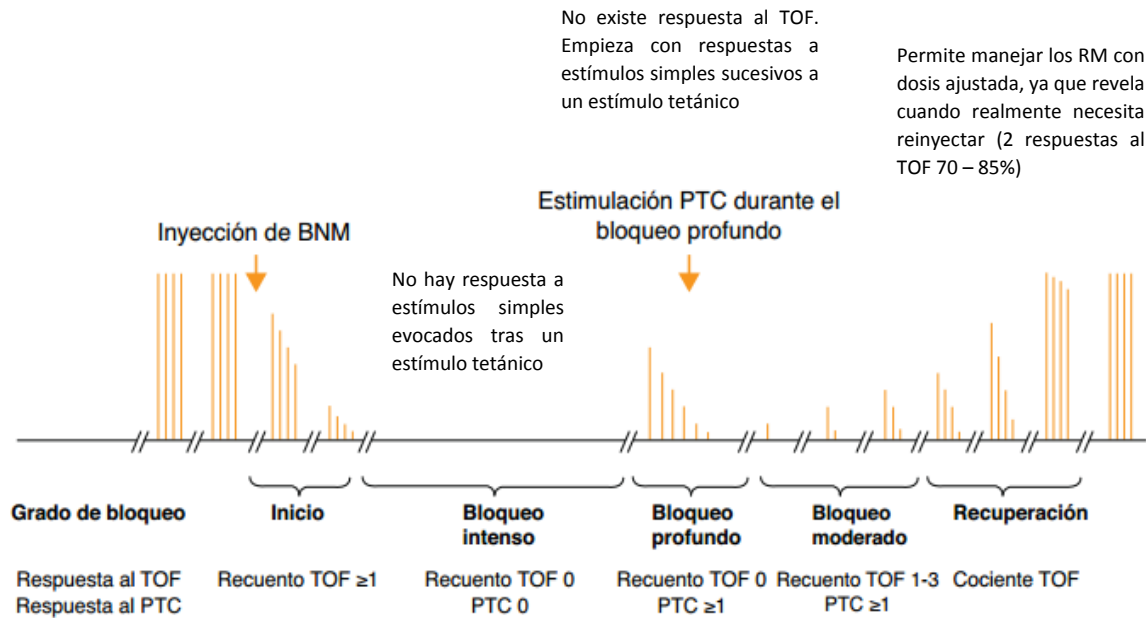


Figura 24: Grado de BNM y monitorización TOF y PTC.

Fuente: López, (2012)

1.2.3.2 EL CONTAJE POSTETÁNICO (PTC)

El recuento de la estimulación postetánica se utiliza cuando el BNM es muy intenso y no hay respuesta al TOF o en aquellas situaciones en la que es necesaria absoluta inmovilidad del paciente. Consiste en la aplicación de un estímulo tetánico de 50 Hz y después de un intervalo de 3 segundos aplicaciones repetidas de 20 estímulos simples de 1 Hz. Este estímulo de gran intensidad no puede ser repetido en menos de 5 o 6 minutos.

El recuento es el número de respuestas que se miden, donde a mayor número de respuestas se produce menor intensidad del bloqueo profundo. Según el PTC se puede deducir en cuanto tiempo (según el tipo del BNM) va a aparecer (T_1) la primera respuesta del TOF.

Con un PTC de 2, la primera respuesta (T_1) del TOF aparecerá después de 25 a 30 minutos, mientras un PTC de 6, la respuesta TOF se dará después de 5 a 10 minutos. En caso del BNMND con VEC, un PTC de 9 coincide con la recuperación de la primera respuesta (T_1) del TOF (Fig. 24).

En los BNMND se presenta un fenómeno conocido como “potenciación posttetánica”, esta es debida a la aplicación de un estímulo tetánico que libera gran cantidad de acetilcolina para compensar la depleción que sucede en el primer momento. La aplicación de un estímulo sencillo o un TOF en los 2 minutos posteriores al estímulo tetánico producirá un aumento en la altura de la respuesta debido al acumulo presináptico de la acetilcolina (Chamorro et al., 2008; Ariño-Irujo et al., 2010).

1.2.3.2 LA DOBLE RÁFAGA (DBS)

La doble ráfaga (doublé burst o DB) consiste en la aplicación de 2 estimulaciones tetánicas de 50 Hz separadas por 750 ms. Hay dos tipos: DBS 3.3, donde cada ráfaga consta de 3 pulsos de onda cuadrada de 200 μ s de duración cada una; el DBS 3.2, que consta de una primera ráfaga de 3 pulsos de onda cuadrada de 200 μ s de duración, cada una seguida por la segunda ráfaga de solo 2 pulsos de onda cuadrada de 0.2 ms de duración cada una.

Este estímulo ayuda a valorar si existe un efecto residual de los BNM, ya que induce una respuesta de mayor magnitud del TOF. Una diferencia en la intensidad de contracción en la segunda respuesta implicará efecto residual, mientras que las dos respuestas con la misma intensidad suponen una relación de TOF mayor de 0.6 en el 80% de los casos (Chamorro et al., 2008; Ariño-Irujo et al., 2010).

1.2.4 ROCURONIO

Bromuro de rocuronio (ROC) es un BNMND que pertenece al grupo de los amino esteroideos monocuaternarios, con al menos un átomo de nitrógeno cargado positivamente es un derivado del vecuronio (VEC) de acción intermedia y rápida instauración (Fig. 25). Está indicado en la anestesia general para facilitar la intubación endotraqueal, relajando la musculatura aductora de la laringe y produciendo la relajación de los grandes grupos musculares y por último el diafragma (Anom: Rocuronium 1995; Parreño Caparrós, 2015).

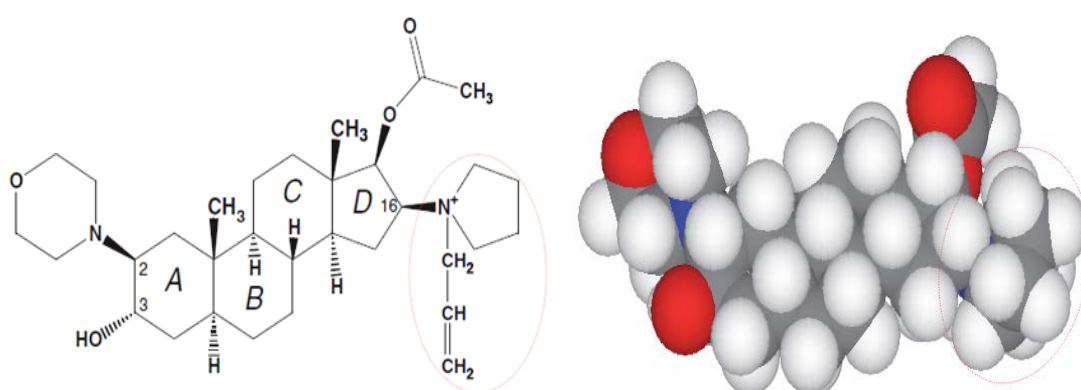


Figura 25: Fórmula química y estructura 3D de ROC

Fuente: Baldo et al., (2011).

El bloqueo muscular se produce por antagonismo competitivo con la acetilcolina de los receptores nicotínicos de la unión neuromuscular y se antagoniza con los anticolinesterásicos (neostigmina) (Mirakhur, 1992; Gómez et al., 2000).

Su farmacocinética es similar a la del vecuronio, diferenciándose por la rapidez de su efecto y menor potencia, siendo 5 o 6 veces menor (Chamorro et al., 2001), por el reemplazo del grupo metilo unido al nitrógeno cuaternario del vecuronio por un grupo anilo y por la ausencia de fragmentos similares a la acetilcolina en el anillo A, explicando así la menor afinidad del rocuronio por los receptores. (Gómez et al., 2000; Granadas Tinajero, 2012; Anom: Rocuronium 1995).

El rocuronio tiene un tiempo de latencia y un comienzo de acción 2 veces mayor que el vecuronio. La aparición del efecto es proporcional a la dosis administrada. Utilizando una dosis estándar de 0,6 mg/kg a los 60 segundos, las condiciones de intubación son adecuadas y la duración clínica de la acción es de 30

a 32 minutos. Utilizando dosis bajas de 0,3 a 0,45 mg/kg se acorta la duración clínica del efecto hasta 22 minutos mientras en dosis altas de 1 mg/kg produce un efecto relajante de hasta 60-70 minutos (Yonfa, 2006; Chamorro et al., 2001; Gómez et al., 2000).

Se une de forma reversible a las proteínas plasmáticas, principalmente albúmina. Los cambios en las concentraciones plasmáticas de proteínas pueden producir pequeñas variaciones en la fracción libre del fármaco, siendo su volumen de distribución de 0.27 l/kg.

La distribución del fármaco por la musculatura esquelética se realiza por simple difusión desde los capilares hacia el líquido extracelular alcanzando la placa motora. (Anom: Rocuronio. 1995; Hermoza, 2002.; Bozzo et al., 2000).

La principal vía de eliminación es hepática, por secreción biliar y metabolización hepato-biliar (>70%), y menos del 10-20% por vía renal, encontrándose en orina el 20-25% de la dosis administrada con ausencia de metabolitos medibles (desacetil metabolitos) después de 24 horas (Tabla 4).

Los efectos clínicos indeseables a nivel cardiovascular están relacionados con el bloqueo de los receptores muscarínicos M₂ (ubicados en aurícula y pulmón) con efecto vagolítico por bloqueo del nódulo sinusal en dosis altas, que se traducirá clínicamente en broncoespasmo y taquicardia que puede ayudar a prevenir la bradicardia intraoperatoria. Debido a su estructura esteroidea y reducidas dosis, tiene baja capacidad de liberar histamina, sin producir cambios hemodinámicos (Bozzo et al., 2000). El ROC por ser un esteroideo, puede comportarse como antígeno y puede provocar reacciones anafilácticas con baja incidencia (Chamorro et al., 2001).

En términos generales los BNMND tienen el mismo efecto en niños mayores de 3 años que en los adultos. Sin embargo hay diferencias en los recién nacidos y niños pequeños. El recién nacido tiene bajos niveles de la enzima pseudocolinesterasa implicando mayor resistencia a la succinilcolina. Otro factor importante es la mayor sensibilidad a los receptores colinérgicos en los neonatos, implicando que las concentraciones de BNMND deban ser más reducidas.

El volumen sanguíneo y el volumen del líquido extracelular son mayores en el recién nacido y niño comparado con el adulto en base al peso, lo que implica que las dosis utilizadas son semejantes a las empleadas en adultos, pues las diferencias existentes en la sensibilidad de los receptores se compensan con el mayor volumen de distribución. La dosis empleada en niños de 1 a 5 años de edad es de 0.6 mg/kg, produciendo el bloqueo neuromuscular en un tiempo máximo de 1 minuto en excelentes condiciones de intubación a los 60 segundos y con una duración clínica de 30 minutos, siendo estos parámetros semejantes a los adultos (Yonfa, 2006).

FARMACO (BNMND)	Vd (ml/kg)	Eliminación renal (%)	Eliminación biliar (%)	Metabolismo
ROCURONIO	207-280	9	54	Hepático (escaso)
VECURONIO	199-260	15-18	40	Hepático (parcial)
d-TUBOCURARINA	297-450.	45-63	12	Hepático (escaso)
PANCURONIO	200-260	40-67	10	Hepático (mínimo x hidroxilación)
PIPECURONIO	220-350	37-41	2	Hepático (escaso)

Tabla 4: Resumen de las diferencias entre el VEC y ROC y otros BNMND.

Fuente: Bozzo et al., 2000.

1.2.5 VECURONIO

Bromuro de Vecuronio es un BNMND que pertenece al grupo de los amino esteroides mono-cuaternarios, relacionado con el pancuronio. Es hidrófilo y relativamente más lipófilo que el pancuronio, característica que permite una mayor penetración en las estructuras lipídicas. Su duración de acción es intermedia y puede ser utilizado en perfusión continua.

Respecto a su farmacocinética, presenta una potencia 5 o 6 veces mayor que el rocuronio, con un tiempo de latencia 2 veces menor que el rocuronio. Su inicio de acción, después de una dosis de intubación de 0,1mg/kg, es de aproximadamente 2,5 minutos y con una duración clínica de aproximadamente 20-40 minutos.

Se une a las proteínas plasmáticas en un 30%, la captación hepática es rápida, produciéndose un rápido descenso de las concentraciones plasmáticas en la fase de distribución y con la vida media de distribución variando entre 3 y 5 minutos (Bozzo 2004; Granados Tinajero 2011).

El vecuronio es metabolizado en el hígado (30-40%), sufre una hidrólisis por desacetilación dando lugar a tres metabolitos (3-OH-vecuronio, 17-OH-vecuronio y 3,17-OH-vecuronio). El 3-OH-vecuronio tiene una potencia bloqueante de aproximadamente el 80%, los otros dos metabolitos son inactivos. Un 40 a 45% (dosis 0.15 mg/kg) es eliminado por la bilis sin ningún cambio y el 33% es eliminado en forma de metabolitos (Antuña et al., 2000; Granados Tinajero 2011).

El riñón no es la vía principal de eliminación, solamente el 30% (a dosis de 0.15 mg/kg) se elimina en orina con una vida media de eliminación entre 50 y 116 minutos y un aclaramiento de 5 ml/kg/min (Gómez et al., 2009; Granados Tinajero 2011 Bozzo et al., 2000) (Tabla 5).

En perfusión continua la dosis de carga es de 0.075 mg/kg, seguida por la misma dosis por cada hora de sedación. Se recomienda monitorizar (manteniendo la respuesta al primera estímulo de TOF) para prevenir efectos acumulativos.

Tiene pocos efectos colaterales, debido a su lipofilidad, y mayor selectividad sobre la placa motora que el pancuronio. No altera la función cardiovascular y el efecto vagolítico es suprimido debido a la eliminación del grupo metilo cuaternario de la posición 2, lo que elimina su carga positiva y disminuye su similitud a la Ach, no produciéndose liberación de histamina. (Bozzo, 2004; Antuña et al., 2000; Gómez. et al., 2009; Granados Tinajero 2011).

En la población infantil, la dosis administrada es de un 95% inferior, la cual es inferior en un 40% de niños menores de 1 año, en comparación con niños mayores. La intubación puede llevarse a cabo en aproximadamente 2 minutos después de la dosis. Las necesidades de mantenimiento son 2 veces mayores en los niños de 3 a 10 años. Administrando una dosis de intubación de 0.07 a 0.1 mg/kg en el recién nacido, 0.1 mg/kg en niños de 1 mes a 1 año o 0.15 mg/kg en el niño de 1 a 12 años, la duración de la acción es de 60 minutos en los niños menores de 1 año, 20 min en niños de 3 a 10 y 37 minutos en los adolescentes mayores de 13 años.

La inmadurez hepática presente en neonatos y niños de hasta 1 año probablemente explica el aumento significativo en la duración de la acción mediante el alargamiento de la duración de la eliminación. Vecuronio debe considerarse como un relajante muscular de acción prolongada en niños menores de 1 año (Meistelman et al., 1998).

FARMACO (BNMND)	INICIO (min)	DURACIÓN (min)	DOSIS INTUBACIÓN (mg/kg)	ELIMINACIÓN	METABOLITOS
ROCURONIO	1,5	30 – 60	0,6 – 1,0	Hígado (>70%) Riñón (<10%)	17-desacetil.roc 16N-desacetil.roc
VECURONIO	2,5	35 – 45	0,1 – 0,2	Hígado (50/60%) Riñón (40-50%)	3-desacetil.Vec 17-desacetil.vec 3-17-desacetil.vec

Tabla 5: Resumen de las diferencias entre el VEC y ROC.

1.3 SUGAMADEX, DESBLOQUEANTE DE BNMND

Todos los reversores neuromusculares utilizados en la práctica anestesiológica, son inhibidores de la acetilcolinesterasa (neostigmina y edrofonio).

Con la introducción del sugamadex (SUG) por la Comisión Europea para la comercialización y uso humano el 25 de Julio de 2008 (EMA), se ha iniciado un verdadero avance en la reversión selectiva del bloqueo neuromuscular inducido por BNMND aminoesteroides, rocuronio y vecuronio (Naguib, 2007; de la Torre-Anderson et al., 2014; EMA, 2008).

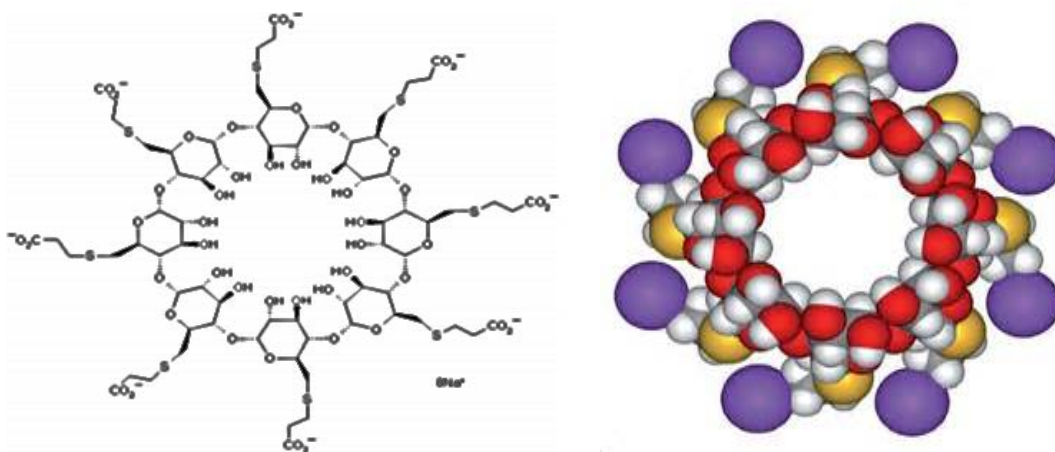


Figura 26: Estructura del Sugamadex y Estructura química 3D de la γ -ciclodextrina.

Fuente: Nag et al., (2013); Murphy, (2016).

Sugamadex es una molécula γ -ciclodextrina modificada de estructura circular ($C_{72}H_{104}O_{48}S_8Na_8$ per-6-(2-carboxietiltiltio)-per-6-deoxi- γ -ciclodextrina-sódica), compuesta por 8 moléculas glucosa (con enlaces de tipo α entre los carbonos 1 y 4 de los ciclos de glucosa) dispuestas en anillo con una cavidad interna lipofílica (hidrofóbica) y el exterior hidrófilo, atribuible a iones cargados negativamente en su superficie, atrayendo a las cargas cuaternarias positivas del rocuronio y vecuronio introduciéndolos al interior de su cavidad, permitiendo el encapsulamiento de su anillo esteroideo y formando el complejo de inclusión (Fig. 26). Este complejo queda atrapado en la cavidad central de la ciclodextrina de forma estable y duradera, debido a la modificación que incluye en su estructura interior los ocho grupos carboxilos cargados negativamente que va a incrementar la afinidad por el rocuronio mediante la interacción electrostática.

Por ello las moléculas de rocuronio y vecuronio son atraídas al interior del sugamadex a través de las fuerzas de Van der Waals, e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, siendo encapsuladas e inactivadas las moléculas de rocuronio y vecuronio revirtiendo rápida y completamente sus efectos (Palanca et al., 2013; Parreño Caparrós, 2015) (Fig. 27 a, b, c y d).

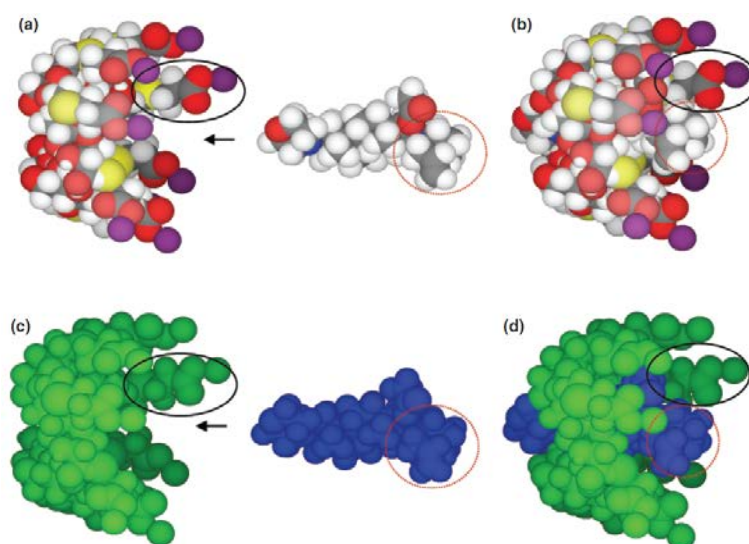


Figura 27 (a, b, c, d): Estructura espacial 3D de SUG + ROC formando su complejo.

Fuente: Baldo, B. A., McDonnell, N. J., & Pham, N. H. (2011).

Figura 27: SUG + ROC: a y b de coloración normal; c y d mono color para distinguir las moléculas demostrando el encapsulamiento 1:1.

La constante de equilibrio, describe la afinidad entre las dos moléculas de unión. La afinidad de rocuronio por el sugamadex es $25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Por cada 25 millones de complejos SUG-ROC únicamente 1 se va a disociar, mientras que para vecuronio es $10 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Es decir, la afinidad por rocuronio es 2,5 veces mayor comparado este con el vecuronio (Schaller & Fink, 2013; Parreño Caparrós, 2015). Esta interacción es compacta y de larga duración y es específica para los RNMND de tipo aminoesteroideos y no tiene afinidad por los bencilisoquinólicos (Bom et al., 2002; de la Torre-Anderson et al., 2014; Darias et al., 2014; Cordero Escobar et al., 2011).

Sugamadex es un verdadero antagonista y su mecanismo de acción se produce por su alta afinidad y gran selectividad. Se produce la formación del complejo SUG-ROC, en una proporción 1:1 y consiste en una fase inicial con el

atrapamiento de las moléculas de rocuronio libres en el plasma sanguíneo y otra fase en la cual las moléculas localizadas en la placa motora (unión neuromuscular) pasan al plasma para ser encapsuladas por la molécula de sugamadex. Esto ocurre debido al gradiente de concentración con difusión pasiva desde el receptor nicotínico postsináptico. A continuación se produce la reversión del bloqueo neuromuscular en un tiempo aproximado de 2 minutos restaurando la función neuromuscular (Veiga-Ruiz et al., 2008; Karalapillai et al., 2013; Eguiluz, 2009; Parreño Caparrós, 2015) (Tabla 6).

Paciente (edad)	BNM	Tipo de reversión	Dosis SUG
Adulto (>18 años)	ROC/VEC	Moderada	2 mg/kg
Adulto	ROC/VEC	Profunda	4 mg/kg
Adulto	ROC	Inmediata	16 mg/kg
Niños y adolescentes (2 - 17 a)	ROC	Moderada	2 mg/kg

Tabla 6: Tabla dosis SUG para la reversión con ROC.

La dosis de administración va a depender del nivel de BNM capaz de revertir y no del tipo de anestesia aplicado (Kovac, 2009). La dosis para un bloqueo profundo será de 4 mg/kg de sugamadex y el tiempo medio para recuperar el ratio T4/T1 a 0,9 es de unos 3 minutos. Se recomienda para un bloqueo moderado inducido por rocuronio o vecuronio, la administración de sugamadex a dosis de 2 mg/Kg. Así el tiempo medio para recuperar el ratio T4 / T1 a 0,9 será de alrededor de 2 minutos. Si se precisa de una reversión clínica inmediata, después de 3 minutos de administrar una dosis en bolus de 1,2 mg/kg de rocuronio, se administrarán 16 mg/Kg de sugamadex, pudiéndose esperar una recuperación del ratio T4/T1 a 0,9 en un tiempo medio de 4 minutos (Parreño Caparrós, 2015). Para pacientes pediátricos la dosis será de 2 mg/Kg. (Tabla 6). En caso que se produzca un BNMND postoperatorio después de haber administrado una dosis inicial de sugamadex de 2

mg/kg o 4 mg/kg, se recomienda la repetición de dosis de sugamadex de 4 mg/kg. (Martínez, 2009; Cordero Escobar et al., 2011; Karalapillai et al., 2013; Eguiluz, 2009; de la Torre-Anderson et al., 2013).

El sugamadex presenta una farmacocinética lineal en el rango de dosificación de 1 a 16 mg/kg vía intravenosa en bolus. En su distribución, no hay afinidad a las proteínas plasmáticas (albúmina) y el volumen de distribución de sugamadex es de 10 a 15 litros, reduciendo Vd de SUG-ROC de 50 litros a 15 litros. El rocuronio queda secuestrado en forma de complejo SUG-ROC aumentando su concentración plasmática. La vida media ($t_{1/2}$) para su eliminación se estima en alrededor de 2 horas, y el aclaramiento plasmático estimado es de 88 ml/min aproximadamente, con función renal normal.

La única vía de eliminación es la excreción renal del producto inalterado (>90%) antes de las 24 horas de su administración. El complejo SUG-ROC encapsulado se filtra libremente por el glomérulo en la orina, siendo el aclaramiento renal del complejo igual que el filtrado glomerular (120 ml/min) (Farrar, 2008; Darias et al., 2014; Ripoll Coronado, 2014). (Tabla 5).

Debido a su arquitectura singular (sustitución en cada sexto carbono de un grupo hidroxilo por un carboxilo tioeter y la sustitución de los grupos hidroxilo en el segundo, tercero y sexto carbono por grupos lipofílicos en los átomos de la glucosa base), además de un pH de 7,5 (con la osmolaridad entre 300 - 500 mmol/Kg), su carga y su alto peso molecular (2178 daltons), hacen que el fármaco sugamadex presente una transferencia muy baja a través de la barrera hematoencefálica (<3% en ratas) y placentaria (<6% en ratones y conejos) y un mejor encapsulamiento para la unión con el rocuronio. Esta particularidad aparentemente se opone a cualquier toxicidad significativa dentro del sistema nervioso central derivada del sugamadex. (Farrar, 2008; Parreño Caparrós, 2015).

En diferentes condiciones clínicas con alteraciones moderadas o severas de la integridad de la barrera hematoencefálica, como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas (Shlosberg et al., 2010) como enfermedad de Alzheimer (EA)

(Bell & Zlokovic, 2009), enfermedad de Parkinson (Stolp & Dziegielewska, 2009) o en la esclerosis múltiple (Waubant, 2006) y en procesos traumáticos como la isquemia (Kaur & Ling, 2008), la meningitis (Mook-Kanamori et al., 2011) o en el sistema nervioso inmaduro (Saunders et al., 2000) pueden dar lugar a una neurotoxicidad potencial inducida por el fármaco.

En las interacciones con otros fármacos, si se unen y desplazan al BNDM, como ocurre con el toremifeno (tratamiento en cáncer de mama), flucloxacilina o ácido fusídico, ambos tienen una afinidad relativamente alta por el sugamadex, por lo que pueden interferir en la reversión del BNM hasta un TOF de 0.9, retrasando el tiempo de recuperación e incluso la recurarización del paciente (Parreño Caparrós, (2015).

Otro tipo de interacción, como ocurre con los anticonceptivos hormonales, podrá afectar a su eficacia; la interacción entre el sugamadex (4 mg/kg) y el progestágeno va a producir una disminución similar a la que se observa si una dosis diaria de un anticonceptivo oral se toma con 12 horas de retraso, lo que puede conducir a una disminución de la efectividad.

En el caso de los estrógenos, la administración de una dosis en bolus de sugamadex se considera el equivalente al olvido de una dosis diaria de anticonceptivo esteroideo oral (ya sea combinado o sólo con progestágenos). En el caso de anticonceptivos hormonales no orales, la paciente debe utilizar un anticonceptivo alternativo no hormonal durante los siguientes 7 días. (EMEA 2008).

Los datos agrupados de seguridad preclínica fueron obtenidos de los documentos de información de la FDA americana (FDA. 2008) y del documento científico de la Agencia Europea del Medicamento (EMEA) (EMEA 2008), donde la seguridad del sugamadex se evaluó en 3519 pacientes, a través de una base de datos conjunta de seguridad fase I-III. Se notificaron reacciones adversas en los ensayos clínicos controlados con placebo en pacientes que recibieron anestesia y/o BNM (1078 pacientes SUG y 544 pacientes con placebo).

Las reacciones adversas que se presenta son reacciones cutáneas aisladas o reacciones sistémicas graves de hipersensibilidad, trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos, se describieron espasmos relacionados con el final de la anestesia o con la extubación, bradicardias acusadas y tos de forma frecuente, lesiones traumáticas, intoxicaciones y complicaciones de procedimientos terapéuticos como son movimientos de las extremidades.

Entre otros efectos adversos publicados de sugamadex se incluyen disgeusia (a 32mg/Kg de sugamadex) sequedad faríngea, laríngea y de boca, cambios de la temperatura (escalofríos), parasomnia, parestesia, eritema leve, malestar abdominal, bradicardia, taquicardia, mareos, aumento en orina de la creatinina fosfoquinasa y de β -2 microglobulina (β 2M) que puede provocar daño renal por isquemia (Kovac, 2009; Abrishami et al., 2009; Peeters et al., 2010).

Hay que tener en cuenta que la información disponible sobre el sugamadex es limitada y escasa en el caso de condiciones especiales de la población como insuficiencia renal grave. En este último caso la exposición total de sugamadex, se prolonga 17 veces más y hasta las 48h después de su administración son detectables en concentraciones bajas; mientras no hay datos por la población pediátrica (Darias et al., 2014).

1.4 NEOSTIGMINA

La neostigmina es un anticolinesterásico constituida por moléculas de amonio cuaternario, que producen inhibición de la enzima acetilcolinesterasa mediante la formación reversible de un complejo éster carbamilo en la porción de la parte activa de la enzima colinesterasa, formando un enlace covalente en los lugares tanto aniónicos como esterásicos.

En el complejo éster carbamilo existe una transferencia del grupo carbamato de las moléculas de neostigmina a la parte éster de la enzima acetilcolinesterasa. Mientras esta unión permanezca, la enzima será incapaz de hidrolizar a la acetilcolina. De esta forma aumentan los niveles de acetilcolina favoreciendo la interacción entre la acetilcolina y el receptor y revertiendo el BNM, actuando como un inhibidor competitivo de la enzima acetilcolinesterasa (Darias et al., 2014; Barbosa & Cunha, 2012; Neostigmina Anes Net) (Fig. 28a). Además, induce bloqueo de los canales lentos de potasio en las terminaciones nerviosas motoras produciendo un aumento del nivel de liberación de acetilcolina y estimulando a los receptores postsinápticos aumentan la amplitud de los potenciales de la placa terminal y favoreciendo la restauración de la función neuromuscular. Esto ocurre porque dichos receptores se acercan más a favor de la acetilcolina y menos hacia el relajante muscular no despolarizante (Neostigmina Anes Net; Ortiz-Gómez & Pérez-Cajaraville, 2006).

La administración de la neostigmina es por vía intravenosa (IV) en dosis de 0,043 mg/kg. Debido a su composición es poco liposoluble y con una débil absorción gastrointestinal. En el tratamiento oral de la miastenia gravis (el sistema inmune del paciente produce anticuerpos contra los receptores nicotínicos de la Ach) la dosis es de 30 veces mayor que la dosis por IV (dosis total diaria 15-375 mg). Su Vd es de 0,7 l/kg, su aclaramiento renal y metabolismo hepático es del 50% y con función renal normal es de 9 ml/kg/min. El principal metabolito hepático es el 3-hidroxifenil trimetilamonio, con una actividad antagonista de 1/10 (Darias et al., 2014).

Las reacciones adversas son las mismas que las relacionadas con hipersensibilidad a las anticolinesterasas. Debe ser utilizada con precaución en pacientes con asma bronquial, bradicardia, arritmias cardíacas e hipertiroidismo.

En casos de sobredosificación se presentan efectos muscarínicos y concretamente a nivel del sistema nervioso central, ataxia, convulsiones, coma o depresión de la capacidad de ventilatoria. La sobredosificación de los anticolinesterásicos produce efectos muscarínicos descontrolados. Con la adición de los efectos nicotínicos produce en los músculos esqueléticos debilitados, calambres o parálisis. En el sistema nervioso central provoca confusión, ataxia, convulsión o depresión de la ventilación. El tratamiento consistirá en la administración de un anticolinérgico, atropina IV 30-70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cada 3-10 minutos, hasta que desaparezcan los efectos muscarínicos (Neostigmina Anes Net).

1.5 NEOSTIGMINA VS SUGAMADEx

Para la reversión del BNMND de tipo aminoesteroido rocuronio y vecuronio, se han utilizado inhibidores de la acetilcolinesterasa como la neostigmina y el edrofonio que impiden la degradación de la acetilcolina a nivel de la unión neuromuscular, esto favorece su acción competitiva con los BNM, y con las desventajas de los efectos colinérgicos sistémicos y de ineficacia a la reversión del BNM profunda y a la estimulación de receptores colinérgicos muscarínicos con efectos secundarios al nivel cardiovascular (bradicardia e hipotensión), pulmonar (broncoconstricción) y/o gastrointestinal (nausea, vómitos e hiper-salivación). Estos efectos podrían ser minimizados con la administración simultánea de antagonistas de receptores muscarínicos como la atropina o el glicopirrolato (Darias et al., 2014). Teniendo en cuenta lo anteriormente indicado, fue necesario el uso de nuevos agentes reversores con mínimos efectos adversos con la capacidad de revertir el BNM de forma eficaz y dependientemente del tipo de bloqueo. El sugamadex podía cubrir esta laguna terapéutica, ya que era capaz de revertir rápidamente el BNM, tanto moderado como profundo, inducido por rocuronio y vecuronio (Veiga-Ruiz et al., 2008) (Fig.28 b).

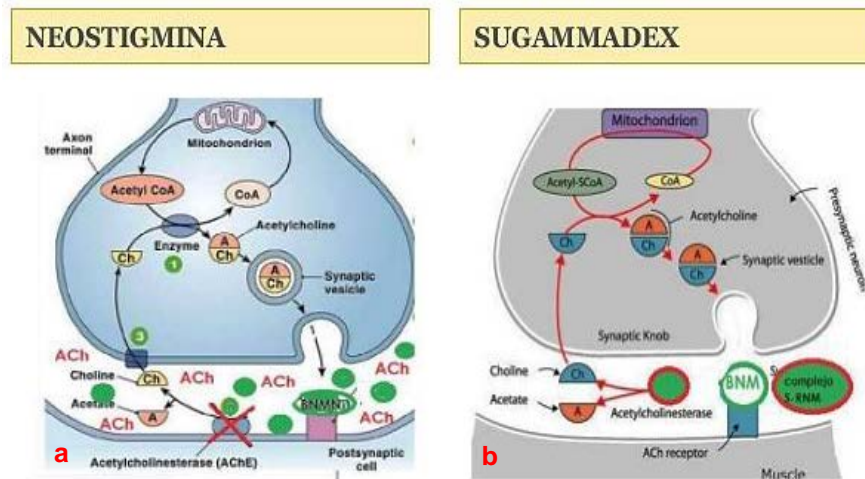


Figura 28 a, b: Mecanismo de acción de la Neostigmina y del Sugamadex.

Fuente: <http://es.slideshare.net/gisselita/bloque-neuromuscular-residual>

Desde que la Comisión Europea emitió una autorización en julio de 2008 de comercialización, válida para toda la Unión Europea, para el uso humano de Sugamadex (EMEA 2008), se han realizado numerosos ensayos clínicos que han analizado las diferencias en la reversión de los BNMND con Sugamadex o con Neostigmina (Tabla 7 y 8).

Según los autores reflejados en las tablas 7 y 8, que aportan datos referentes a la recuperación del bloqueo neuromuscular con SUG y NEO, inducido por ROC y VEC, se observa que a dosis equivalentes de bloqueo, la recuperación con el SUG se consigue a tiempos inferiores en todos los casos (Darias et al., 2014; Luque López et al., 2009; Khuenl-Brady et al., 2010; Lemmens et al., 2007; Paton et al., 2010; EMEA, 2008; Gaszynski et al., 2011; Jones et al., 2008).

REVERSION DE BNMND PROFUNDO (RECUPERACIÓN DEL T ₄ /T ₁ a 0.9)			
AUTOR	BNM	NEOSTIGMINA 70mcg/kg	SUGMMADEX 4mg/kg
Luque-Lopez et al., 2009	ROC 0.6mg/kg	49 mins	2.7 mins
Jones et al., 2008	ROC 0.6mg/kg	50.4 mins	2.9 mins
EMEA 2008	ROC 0.6mg/kg	49 mins	2.7 mins
Luque-Lopez et al., 2008	VEC 0.1mg/kg	49.9 mins	3.3 mins
Lemmens et al., 2007	VEC 0.1mg/kg	66.2 mins	4.5 mins
EMEA, 2008	VEC 0.1mg/kg	49.9 mins	3.3 mins

Tabla 7: Tabla comparativa en la reversión del BNMND profundo con NEO y SUG.

REVERSION DE BNMND MODERADO			
(recuperación del T ₄ /T ₁ a 0.9)			
AUTOR	BNM	NEOSTIGMINA 50mcg/kg	SUGMMADEx 2mg/kg
Luque-López et al., 2009	ROC 0.6mg/kg	17.6 mins	1.4 mins
Paton et al., 2010	ROC 0.6mg/kg	17.6 mins	1.4 mins
EMEA, 2008	ROC 0.6mg/kg	17.6 mins	1.4 mins
Gaszynski et al., 2011	ROC 1.0mg/kg	9.6 mins	2.7 mins
Luque-López et al., 2009	VEC 0.1mg/kg	18.9 mins	2.1 mins
Paton et al., 2010	VEC 0.1mg/kg	18.9 mins	2.1 mins
EMEA, 2008	VEC 0.1mg/kg	18.9 mins	2.1 mins
Khuenl-Brady et al., 2010	VEC 0.1mg/kg	17.9 mins	2.7 mins

Tabla 8: Tabla comparativa en la reversión del BNM moderado con NEO y SUG.

1.6 MUERTE CELULAR

La apoptosis y la necrosis (Virchow, 1858) son dos mecanismos mediante los cuales puede ocurrir la muerte celular (Fig. 29,30 y 31). El término necrosis implica la rotura de la membrana e hipoxia, lo que produce una disminución de las concentraciones del ATP, liberación de enzimas lisosomales, colapso metabólico, edematización y disolución de la célula, provocando un proceso inflamatorio (Becerra & Pimienta, 2009; Torres & Vargas, 2012). En cambio la apoptosis no origina un proceso inflamatorio ya que la célula se dirige a muerte celular sin rotura de la membrana celular.

La primera descripción del fenómeno de la apoptosis la realizó William Councilman en 1890. En 1914 Robert Schröder describe la presencia de partículas con la cromatina condensada “*picnótica*” en las glándulas endometriales (necrosis por encogimiento) y fue en 1972 cuando se empezó a utilizar el término apoptosis.

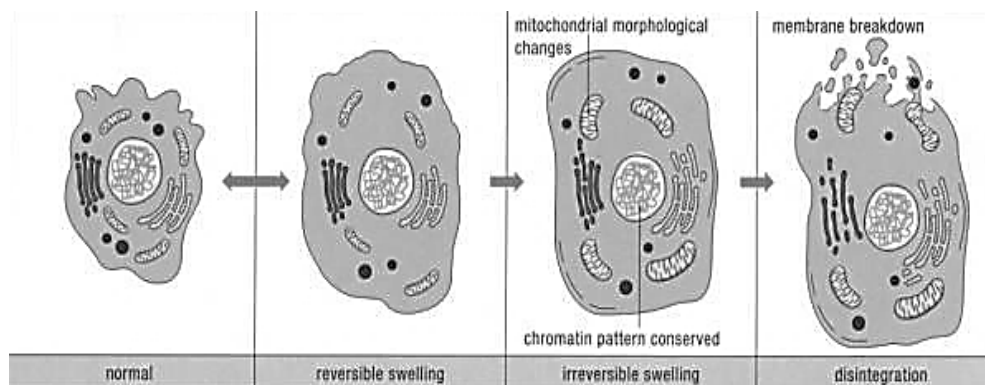


Figura 29: Muerte celular por necrosis.

Fuente: [http://www.ifcc.org/ifcc-communications-publications-division-\(cpd\)/ifcc-publications/ejifcc-\(journal\)/e-journal-volumes/ejifcc-2002-vol-13/vol-13-n%C2%B0-5/apoptotic-death-of-beta-cells/](http://www.ifcc.org/ifcc-communications-publications-division-(cpd)/ifcc-publications/ejifcc-(journal)/e-journal-volumes/ejifcc-2002-vol-13/vol-13-n%C2%B0-5/apoptotic-death-of-beta-cells/)

La apoptosis, o muerte celular programada, afecta a células individuales más que a todas las células de un tejido y constituye una medida fisiológica de renovación celular. Estando bajo control genético, se caracteriza por el colapso celular, condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Fig.30).

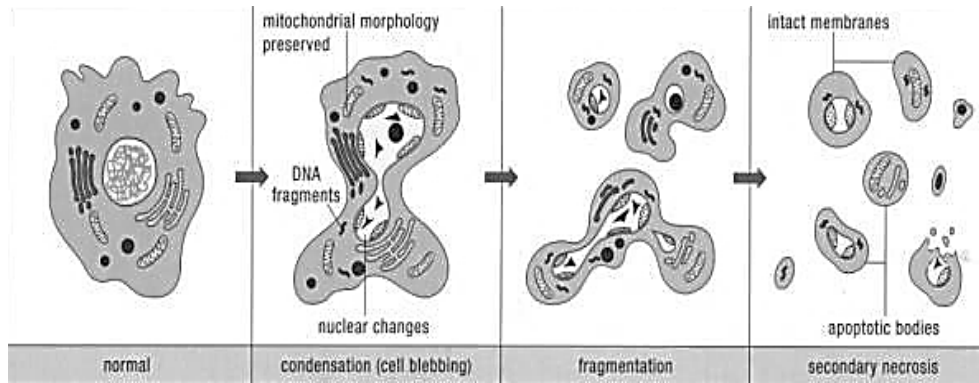


Figura 30: Muerte por apoptosis.

Fuente: *www.ifcc.org* 2002 vol. 13 nº 5 *apoptotic-death-of-beta-cells*.

Las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por macrófagos, evitando así una reacción inflamatoria por secreción de citocinas y por lo tanto, manteniendo la homeostasis tisular que asegura el estado de salud del organismo. En el sistema nervioso del adulto puede ser inducida por diversos factores externos como isquemia, trauma, infecciones y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Esclerosis Lateral Amiotrófica. Además son fundamentales en las interacciones entre las células del sistema vascular, glial y neuronal (Becerra & Pimienta, 2009; Torres & Vargas, 2012; Ortega-Camarillo et al., 2001).

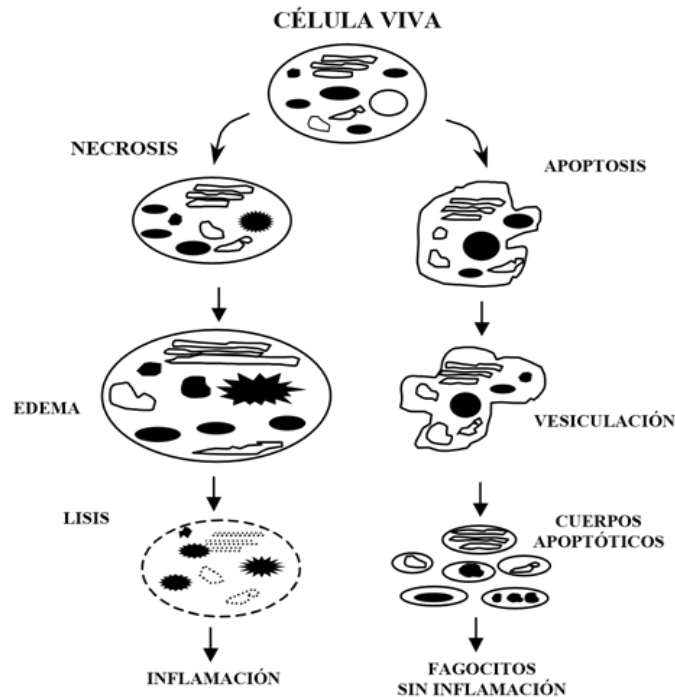


Figura 31: Secuencia de la muerte celular por necrosis y por apoptosis.

Fuente: Ortega-Camarillo et al., (2001)

El proceso apoptótico se diferencia en 3 etapas: la primera fase de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte. La segunda fase, de ejecución donde se producen los cambios morfológicos y bioquímicos característicos y una tercera fase, de eliminación de los restos celulares, que son degradados por células fagocíticas (macrófagos).

La fase de iniciación:

La apoptosis puede ser desencadenada por diferentes señales intracelulares, como el estrés biológico, que provoca la liberación por parte de la mitocondria del Citocromo c, induciendo la vía intrínseca y otras señales como la inflamación local o generalizada producida por tóxicos, bacterias o virus. Las señales proapoptóticas se desencadenan por la unión de FAS (receptor de muerte) a su ligando (Fig.32), induciendo la vía extrínseca.

La fase de ejecución:

En la célula apoptótica se produce una disminución del citoplasma con disminución del tamaño, condensación y fragmentación de la cromatina alrededor de la envoltura nuclear y la generación de vesículas que contienen parte de la cromatina y de los orgánulos celulares que van a constituir los cuerpos apoptóticos. Por otra parte se producen cambios en la mitocondria, como desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis del ATP, estrés oxidativo, reducción del potencial transmembrana y liberación del Citocromo c al citoplasma.

Los cambios a nivel bioquímico de la señal de apoptosis que recibe la célula van a ser transmitidos a través de las enzimas caspasas. Estas enzimas constituyen una familia de proteasas de cisteína que muestran entre si semejanzas en la secuencia de aminoácidos, en la estructura y en la especificidad. Son sintetizadas como pro-enzimas requiriendo un proceso proteolítico para su activación (hidrólisis del polipéptido inactivador de caspasas). Actualmente se conocen 14 caspasas, de las cuales 6 están relacionadas con procesos inflamatorios y las restantes con apoptosis, dividiéndose en caspasas iniciadoras (8, 9 y 12) y ejecutoras (2, 3 y 6) (Casanova, 2003).

Como se ha indicado, hay dos vías que llevan hacia la apoptosis, que son la vía extrínseca o mediada por receptor y la vía intrínseca o mitocondrial. La vía extrínseca se inicia por activación de los receptores de muerte localizados en la membrana celular. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR1, el Fas (Apo-1 o CD95), el DR3 (receptor del muerte 3 o Apo-3), el DR4 (receptor del muerte 4), el DR5 (Apo-2) y el DR6, presentes todos en las células nerviosas (Fig.32).

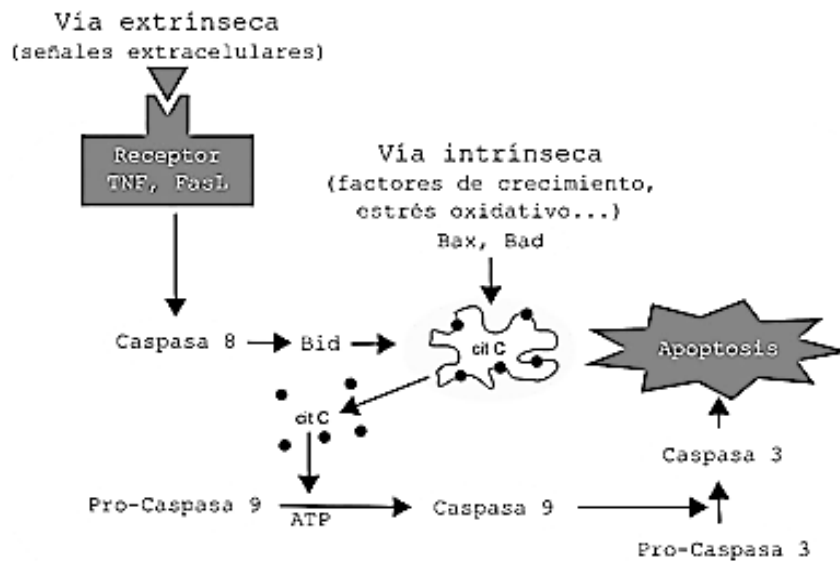


Figura 32: Vías de inducción de la apoptosis.

Fuente: Sabroso, C. M., & Suárez, A. I. T. (2013).

La proteína adaptadora FADD (Fig.33 y 34) media la inmediata activación de la caspasa 8. Una vez activada desencadena la producción de otras caspasas, incluyendo la 3 y paralelamente puede activar la vía intrínseca por activación de la proteína Bid (Fig. 33), lo cual provoca la salida del Citocromo c y del Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica 1) de la mitocondria al citoplasma, para formar el apoptosoma y de esta forma activar la caspasa 9 y la vía intrínseca (Angosto, 2003; Torres & Vargas, 2012). En este proceso apoptótico se requiere la presencia de ATP, el cual marca el inicio de la cadena apoptótica a través de la activación de la caspasa-9. Esta funciona como una caspasa iniciadora que a su vez activa las caspasas 3, 6 y 7, caspasas efectoras que inician la vía intrínseca de la apoptosis.

En última instancia se origina la destrucción de las proteínas estructurales en el citoplasma, se produce la degradación del DNA cromosómico y se inicia la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Yoshida, 2003; Hoyos & García, 2004; Becerra & Pimienta, 2009; Angosto, 2003; Ortega-Camarillo et al., 2001; Li, 1997).

La vía intrínseca o mitocondrial (Fig. 33) se inicia por daño en el ADN, por estrés o por otras señales pro-apoptóticas, como la inducción de proteínas Bcl-2 (B-leucemia-celular-2). Este daño produce un aumento de la apoptosis mediante proteínas activadoras proapoptóticas como Bad, Bax y Bid (subfamilia II y III), que alteran la permeabilidad de la membrana de los orgánulos intracelulares (Gross et al., 1999; Li et al., 1998; Wolter et al., 1997; Puthalakath et al., 1999; Adams et al., 1998). Cuando estas proteínas se unen a la membrana externa mitocondrial, se forman poros o canales que atraviesan la membrana y alteran la permeabilidad reduciendo el potencial de membrana, aumentando el volumen mitocondrial y permitiendo la salida al citoplasma del Citocromo c (Antonsson & Martinou, 2000).

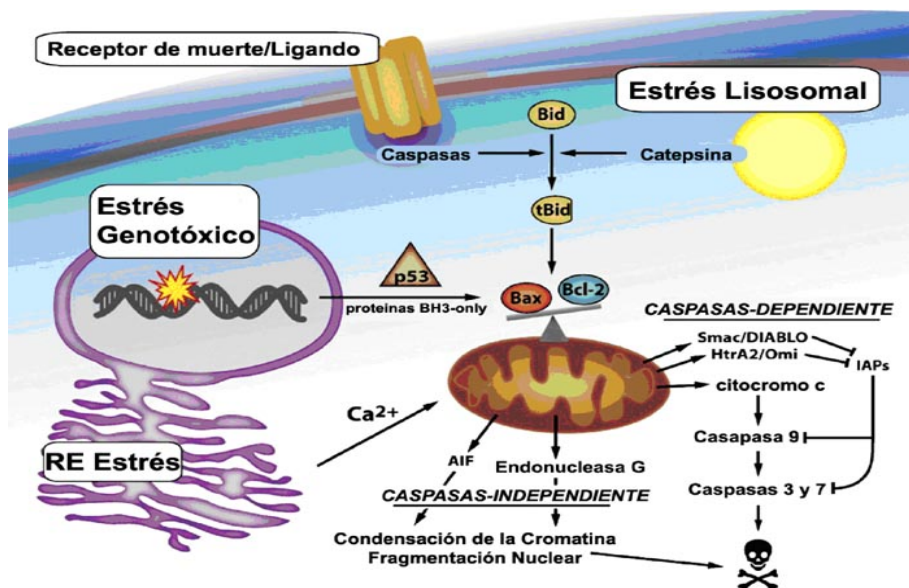


Figura 33: Vías múltiples de estrés celular y la apoptosis.

Fuente: Sterin-Speziale & Leocata Nieto, (2007).

En el exterior de la mitocondria y con presencia del ATP, el Citocromo c se une a la proteína Apaf-1 formando el complejo denominado apoptosoma que hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3. Esta se encarga de ejecutar la apoptosis, generando distintas proteínas cuya suma resultará en el desmantelamiento ordenado y en la muerte de la célula (Torres & Vargas, 2012).

La fase de eliminación:

Las células apoptóticas y sus fragmentos experimentan varios cambios en las membranas que inducen a la fagocitosis. Así son eliminadas antes de sufrir una necrosis secundaria evitando la inflamación. Numerosos receptores de los fagocitos y ligandos inducidos en las células apoptóticas participan en la unión y en su fagocitosis. Sin embargo existen claras evidencias de que no son solo los fagocitos los que participan en esta fase de eliminación, sino también las células dendríticas, epiteliales y los fibroblastos.

El conocimiento de los mecanismos de la apoptosis, permite entender el proceso patológico, bien por la inhibición de la apoptosis como en el cáncer (carcinomas con mutaciones de p53, gliomas y cáncer colorrectal), en los tumores dependientes de hormonas (carcinomas, próstata u ovario) y en enfermedades autoinmunes (miastenia gravis) o bien por el incremento del proceso de la apoptosis, como ocurre en diferentes enfermedades neurodegenerativas (EA, p38, Parkinson, ELA y epilepsia), en el daño a los órganos (Diabetes Mellitus 1 o daño isquémico) o en el Sida (Ortega-Camarillo et al., 2001; Valles et al., 2008).

A P O P T O S I S

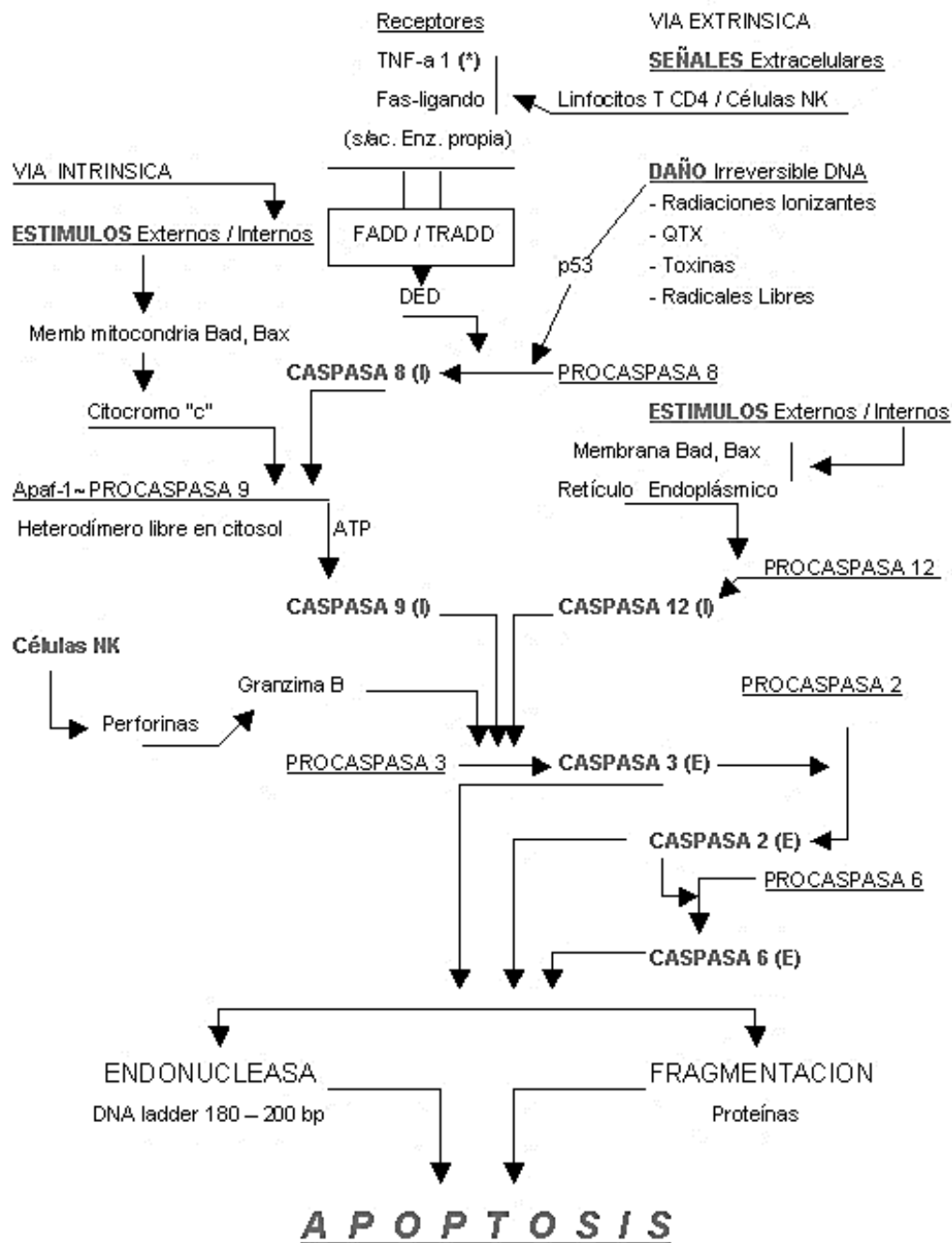


Figura 34: Vías de la apoptosis.

Fuente: Casanova ER. Apoptosis. [www.egoncasanova .cl](http://www.egoncasanova.cl). mayo 2003.

Figura 34: Receptor TNFR1 a través TRADD ->DED -> Apoptosis, pero puede conectarse también mediante proteínas acopladas a Src e inhibir la apoptosis. Fas: Receptores detectados por anticuerpos monoclonales CD95 que unen a la citoquina Fas-ligand. TNFR-1: factor de necrosis tumoral receptor 1 que se une a la citoquina TNF. DD: Dominio de muerte. FADD: proteína Fas de asociación con DD. TRADD: receptor TNF asociado con DD. DED: dominio efector de muerte. Apaf-1: proteasa apoptótica de activación del factor-1. Citocromo c–Apaf–1–Procaspasa 9–ATP: Complejo APOPTOSOMA.

1.6.1 CITOCROMO C

La apoptosis inducida por estrés se inicia con la salida del Citocromo c, proteína proapoptótica, de la mitocondria. Esta salida desencadena la activación de las caspasa 9 y de la proteína Apaf-1 (factor activador de las proteasas apoptogénicas). Dentro de la mitocondria el Citocromo c, implicado en la fosforilación oxidativa mitocondrial, (Figs. 26, 27 y 28) es uno de los componentes requeridos para la activación de la caspasa-9 en el citosol. El complejo III o complejo Citocromo bc1, obtiene dos electrones y se los transfiere a dos moléculas de Citocromo c. Este último es un transportador de electrones hidrosoluble situado en el espacio intermembrana de la mitocondria (Li, 1997; Becerra & Pimienta, 2009). El complejo IV o Citocromo c oxidasa; capta cuatro electrones de las cuatro moléculas de Citocromo c y se transfieren al oxígeno, para producir dos moléculas de agua. Además se translocan cuatro protones al espacio intermembrana, por los cuatro electrones. Por otra parte, cuatro protones formaran el agua al desaparecer de la matriz.

En la célula sana la membrana externa de la mitocondria expresa la proteína Bcl-2 (Figs. 33 y 34) que se une a la proteína Apaf-1, ocasionando el mantenimiento de su inactividad (subfamilia I anti-apoptótica).

Ante cualquier alteración del equilibrio interno de la célula y de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, se produce la liberación del Citocromo c al citoplasma, donde su función cambia al interactuar con la proteína Apaf-1 en el domino WD-40 y con la procaspasa 9 conformando con estas dos proteínas un complejo denominado apoptosoma (Ortega-Camarillo et al., 2001; Becerra & Pimienta, 2009; Hoyos & García, 2004).

1.6.2 FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS (AIF)

El AIF es una proteína situada en el espacio intermembranal de la mitocondria (Fig. 33). Es una barredora contra la acción de los radicales libres y participa en reacciones de oxidorreducción al nivel mitocondrial (Becerra & Pimienta, 2009).

El AIF está localizado en el cromosoma X en los humanos. AIF1 es el más abundante de los tipos de AIF, es trasladado desde el citosol y recolocado en el espacio intermembranal de la mitocondria. Dentro de la mitocondria, AIF pasa a su configuración funcional gracias a la ayuda del cofactor flavin adenin dinucleótido (FAD). AIF funciona como una NADH y NADPH oxidasa, pero actualmente diferentes investigadores han indicado que la zona N-terminal de AIF podría intervenir en las interacciones con otras proteínas o bien controlando las reacciones redox y la especificidad de sustrato (Hangen et al., 2010).

La proteína BAT3, que es utilizada para regular la organogénesis, puede incrementar la vida media de AIF. Como resultado, disminuye la cantidad de BAT3 conduciendo a la fragmentación de AIF. El inhibidor de la apoptosis unido al gen X (XIAP) tiene la capacidad de influenciar, junto a FAD, en la vida media de AIF. Estas dos moléculas no afectan a la unión de AIF a la membrana interna mitocondrial, sin embargo, si que actúan sobre la estabilidad de AIF cuando esta proteína se encuentra en el interior de la mitocondria.

En condiciones de estrés AIF, es liberada desde la mitocondria del mismo modo que el Citocromo c pero hacia el núcleo celular donde desencadena la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN de la célula, con el fin de inducir la muerte celular programada. Además, la proteína AIF es un efector de muerte independiente de las caspasas, tanto iniciadoras como efectoras, que puede producir cambios en el núcleo para entrar en apoptosis (Becerra & Pimienta, 2009; Angosto, 2003).

1.6.3 LA PROTEÍNA SMAC/DIABLO

La proteína SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) o DIABLO (direct IAP binding protein with low pI), es la segunda proteína mitocondrial activadora de las caspasas. Esta proteína se une directamente a las proteínas inhibidoras de las proteínas apoptóticas (IAP's) antagonizando su función (Fig. 33), permitiendo la producción de la apoptosis por las caspasas iniciadoras, como la 9 y efectoras, como la 3, 6 o 7, de esta forma se asegura que estas proteínas antiapoptóticas no puedan parar la muerte celular programada que la célula ha iniciado (Vucic et al., 2002; Becerra & Pimienta, 2009; Angosto, 2003).

Por otra parte, con el fin de conocer los mecanismos "*in vivo*" para conseguir lograr estrategias terapéuticas encaminadas a la prevención y evitar la progresión del cáncer, numerosas investigaciones se han dirigido hacia el diseño y desarrollo de moléculas SMAC de pequeño tamaño miméticas a esta proteína (Bai et al., 2014; Becerra & Pimienta, 2009).

Las rutas iniciadas por el SMAC/DIABLO, AIF o Citocromo c coexisten en una misma célula y se pueden desencadenar por un mismo estímulo (Becerra & Pimienta, 2009). En los últimos años la investigación en enfermedades neurodegenerativas se ha orientado a determinar cuál es la contribución del proceso de apoptosis y a desarrollar las terapias adecuadas para controlar este proceso. Se ha conseguido avanzar tanto a nivel celular en cultivos como en experimentos "*in vitro*", donde el conocimiento tanto de los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular programada, como de las vías de señalización implicadas en dichos mecanismos ha sido y es una prioridad.

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Debido a la introducción paulatina del fármaco SUG en la clínica y de los bloqueantes neuromusculares tipo ROC y VEC, nos planteamos si estos fármacos o su combinación podrían ocasionar muerte neuronal en células en cultivo primario.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

1. Estudiar la viabilidad celular en neuronas en cultivo primario expuestas a la acción del fármaco SUG.
2. Determinar, si es el caso, el tipo de muerte celular detectada (necrosis y/o apoptosis) tras la adición de SUG y analizar las proteínas implicadas en los procesos de muerte celular.
3. Estudiar la viabilidad neuronal en células en cultivo primario expuestas a los relajantes musculares (ROC y VEC) y analizar las proteínas implicadas en los procesos de muerte celular.
4. Determinar la viabilidad celular en neuronas en cultivo primario expuestas a las uniones de ROC con SUG y VEC con SUG y analizar las proteínas implicadas en los procesos de muerte celular.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 MATERIALES

4.1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales de experimentación empleados para el desarrollo de los ensayos *in vivo* fueron ratas hembras de la raza “*Sprague Dawley*” criadas y mantenidas en condiciones higiénicas, de climatización, de humedad y con ciclos de luz/oscuridad de 12/12h, en el animalario de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Las ratas hembras fueron alimentadas con dieta sólida estándar y agua *ad libitum*. Se expusieron al macho, y tras confirmar al siguiente día la presencia de espermatozoides en el tracto vaginal, se aislaron durante 21 días. Las ratas fueron sacrificadas para extraer los cerebros de los fetos con el fin de realizar el protocolo de cultivo primario de astrocitos (Vallés et al., 2010).

Los cultivos primarios de neuronas corticales se prepararon de cortezas cerebrales (5 ratas hembras para obtener los fetos) de fetos de 14-15 días de gestación. Los animales fueron usados, en su justo número, con la intención de minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales usados siguiendo los Comités de Ética locales (Comité de Ética para la investigación animal de la Universidad de Valencia, con código de autorización: 2016/VSC/PEA/00220 tipo 2) basándonos en las guías nacionales y europeas.

El Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, artículo 33, establece las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluidas la docencia. La Ley 32/2007 (art.7), para el cuidado de los animales, transporte, experimentación y sacrificio (B.O.E nº 34/2013) fueron reglamentados por el Parlamento Europeo y el Consejo con el fin de adoptar la Directiva 2010/63/UE, en sus artículos 59.2 y 47.5, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. La Comisión Europea a través de la Recomendación 2007/526/CE de junio de 2007, estableció las directrices relativas al alojamiento y cuidado de los animales utilizados para experimentación.

4.1.2 REACTIVOS

Todos los reactivos fueron usados para los análisis o para la purificación de los cultivos:

- El **anti-AIF**, anti-apoptosis-inducing factor (1:500) es una flavoproteína mitocondrial que puede inducir apoptosis en núcleos aislados. Los estudios han informado que AIF puede inducir la liberación de citocromo c y caspasa 9. La proteína Bcl-2 es conocida por inhibir la liberación de AIF sin afectar a sus funciones de apoptosis. La tinción de AIF en la inmunotransferencia se inhibe específicamente con el péptido inmunizante AIF (aminoácidos humanos, 593-613).

Este producto fue suministrado por Sigma-Aldrich Biotech (Madrid, España).

- El **anti-Cit c**, es un anticuerpo monoclonal de la proteína Citocromo c (1:500) y es una IgG policlonal de conejo proporcionada a 200 g/ml. El antígeno corresponde a los aminoácidos 1-104 que representa la longitud completa del Citocromo c de origen equino, recomendado para la detección del Citocromo c de ratón, rata, humano, equino y Drosophila por detectar WB, IP, IF, ELISA y SC.
- El **anti-MAP-2**, es para un anticuerpo monoclonal MAP-2 (1:500 para el WB y 1:5000 para ELISA). Está asociado a los microtúbulos y es una proteína del citoesqueleto, importante en neuronas y pertenece a una familia de proteínas asociadas a los microtúbulos estables al calor.

Estos dos productos fueron suministrados por Santa Cruz Biotechnology (Barcelona, España).

- El **anti-GFAP** es un anticuerpo monoclonal anti-proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (1:500). Es el principal constituyente de los filamentos intermedios de los astrocitos y sirve como un marcador específico de astrocitos y que distingue a los astrocitos diferenciados de otras células gliales durante el desarrollo del SNC.

- **Anti-Smac/DIABLO** (1:500) revela los aminoácidos N -terminales para la unión de Smac/DIABLO a IAP y la activación de las caspasas, y es expresado en una variedad de tejidos humanos y de ratón.

Estos dos productos los suministró Sigma-Aldrich Biotech (Madrid, España).

- El Ara-C-citosina- β -D-arabinofuranosido-clorídico ($C_9H_{13}N_3O_5 \cdot HCl$), fosforilación de la Ara-CTP y se incorpora al ADN. Inhibe la replicación del ADN mediante la formación de complejos de membrana con la enzima topoisomerasa I produciendo la fragmentación del ADN e induciendo la apoptosis. No inhibe la síntesis de ARN y es agente antileucémico. Se utiliza para prevenir la proliferación de la glía.

Este producto lo suministró Sigma-Aldrich Biotech (Madrid, España).

- El **DMEM** (medio Eagle modificado de Dulbecco) se utiliza ampliamente como un medio basal para fomentar el crecimiento de diferentes células de mamíferos. Las células cultivadas exitosamente en DMEM incluyen fibroblastos primarios, neuronas, células gliales y células del músculo liso.
- El **SFB** (suero bovino fetal o *Fetal Bovine Serum* FBS), es una fracción de la sangre obtenida después de la coagulación y la centrifugación para eliminar los eritrocitos. Para la utilización en cultivos se debe neutralizar mediante calentamiento a 60° C durante media hora.

Estos dos productos se obtuvieron de Gibco life technology (Gibco Invitrogen Corporation, Barcelona, España).

- El **polímero PDL Poly-D-lisina** se utiliza en la preparación de las superficies de las placas de cultivo, con el fin de conseguir la fijación neuronal. También se puede usar con las células que digieren los polímeros de poli-L-lisina y causan una absorción excesiva de L- lisina.

Este producto fue suministrado por Sigma-Aldrich Biotech. (Barcelona, España).

4.1.3 TIPOS DE ENSAYOS

- Ensayo **LOWRY**, es un ensayo bioquímico para la determinación del nivel total de las proteínas en una disolución, donde la concentración total de proteínas se detecta por la diferencia de color con respecto a una proteína dada (BSA=Suero albumina bovina).
- Ensayo **MTT**, se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa dando un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido.
- Ensayo **TUNEL** (Terminal deoxinucleotidil transferasa o marcador terminal de corte de dUTP), es un método común para detectar la fragmentación del ADN debida a cascadas de señalización apoptóticas, marcando el fragmento terminal de los ácidos nucleicos.

El ensayo se basa en la presencia de cortes en el ADN, los cuáles se pueden identificar por la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT) o nucleotidilexotransferasa ADN (DNTP) que catalizará la adición de dUTPs marcados secundariamente con un marcador específico. También podría marcar células que han sufrido daño severo al ADN.

Se obtuvo el ensayo TUNEL de Boehringer, Mannheim, Alemania.

- **WESTERN BLOT** enhanced chemo-luminescent detection system (ECL) o electrotransferencia, es una técnica analítica usada para la detección de proteínas específicas en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular). Mediante una electroforesis en gel, se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc.

Suministro por Amersham Bioscience (Amersham Biosciences, Barcelona, España).

4.1.4 TIPOS DE TINCIONES

Las tinciones utilizadas en este estudio fueron las siguientes:

- La tinción **Hoechst 33342**, colorante fluorescente utilizado para teñir el ADN y el ARN. Emite una fluorescencia azul cuando se une a ADN, núcleos y mitocondrias. Se emplea en la microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (FACS), para distinguir núcleos picnóticos condensados en células apoptóticas, así como para realizar estudios de ciclo celular en combinación con tinción BrdU.

Este producto fue suministrado por Molecular Probes.

- **MitoTracker® Deep Red FM** es un colorante rojo fluorescente (absorbancia/emisión~644/665nm) que tiñe las mitocondrias de las células vivas. Se utilizara para la localización de mitocondrias vivas. El colorante se conserva bien tras la fijación con aldehído e incluso tras la permeabilización posterior con detergentes.

4.1.5 OTROS PRODUCTOS

4.1.5.1 TAMPONES Y AGENTES

- Los conjugados de Anexina V altamente fluorescentes proporcionan métodos de detección rápidos y fiables para el estudio de la externalización de la fosfatidilserina, uno de los primeros indicadores de apoptosis. El tinte Alexa Fluor 488 es un tinte verde fluorescente con unos espectros similares a los de la fluoresceína (FITC o isotiocianato de fluoresceína). Ioduro de propidio (PI) es ampliamente utilizado, en conjunción muchas veces con la anexina V, para determinar si las células son viables, están en apoptosis o en necrosis. Esto se realiza observando las diferencias en la integridad de la membrana, del plasma y de la permeabilidad de la membrana. PI se utiliza con más frecuencia que otros marcadores nucleares porque es económico, estable y

es un buen indicador de la viabilidad celular, debido a su capacidad de no penetración en las células vivas.

La capacidad de PI para entrar en una célula depende de la permeabilidad de la membrana. PI no marca las células apoptóticas en vivo, debido a la presencia de una membrana plasmática intacta.

- Sustrato de ECL, es un quimioluminiscente para la detección de la actividad de anticuerpos y otras sondas de inmunotransferencia (Western blot), suministrado por Pharmacia Biotechnology, (San Francisco, CA).
- El EDTA y sus derivados, tienen la valiosa propiedad química de combinarse con iones metálicos polivalentes en solución para formar complejos coordinados cíclicos no-iónicos, solubles en agua y virtualmente no disociables. A estos complejos se les conoce como quelatos. El cultivo de tejidos, usando EDTA, se utiliza como un agente quelante que se une a calcio y previene la unión de las caderinas entre las células previniendo la agrupación celular en cultivos en suspensión y para separar las células adherentes durante los pases.
- EGTA, es un agente quelante útil para la determinación de calcio en presencia de magnesio.
- FITC fluoresceína-5-isotiocianato, (Fluorescein-IsoTioCyanate), es una molécula que pertenece al grupo de los colorantes de xanteno. Actúa como fluorocromo y es derivado de la fluoresceína. El anticuerpo marcado con un fluorocromo reacciona con el antígeno específico cuya presencia se quiere determinar y se observa el resultado de la reacción con un microscopio de fluorescencia.
- GFP, es una proteína verde fluorescente, se comporta como una señal luminosa capaz de expresarse en células mediante las técnicas rutinarias de transgénesis. Al llevar la fluorescencia incorporada en su estructura, la bioluminiscencia de la GFP puede producirse y mantenerse espontáneamente en aquellas células vivas que incluyan el gen que la codifica, sin necesidad de añadir otros agentes o cromóforos.

Su código genético puede fusionarse a otras proteínas, proporcionando a éstas un dominio fluorescente extra a modo de marca o etiqueta luminosa, que sirve para poder seguir su actividad in vivo, seleccionar y aislar aquellas células que producen la proteína fusionada a GFP o cuantificar la cantidad de dicha proteína producida en un momento dado.

- HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanesulfonic), es un compuesto orgánico de naturaleza de Zwitterión y es también un tampón. Empleado con mucha frecuencia en los cultivos celulares, debido a que se ha demostrado que es un buen controlador del pH fisiológico. Tiene como ventaja frente a otros tampones, como los tampones de carbonato, que además evita los cambios debidos a la liberación de dióxido de carbono producido por el crecimiento celular.
- El PBS (tampón o buffer fosfato salino), es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Es isotónico y no es tóxico para las células. Se utiliza para diluir sustancias utilizadas para el cultivo y para lavar los recipientes que contienen las células. No modifica el perfil de expresión y funcionamiento de la celular normal. El uso de esta solución es muy común para lavar células a través de centrifugación.
- La Rodamina, es un compuesto orgánico heterocíclico fluorescente, basado en el xanteno. Puede considerarse derivado de la fluoresceína. Se utiliza para la tinción de mitocondrias.
- El TBS, se utiliza a menudo en inmunotransferencia, tanto para el lavado de la membrana como para la dilución del anticuerpo primario o secundario.
- El TBST (TBS + Tween 20), es un tampón salino utilizado en el Western Blot.
- El tensoactivo no iónico Tritón-X 100, es un compuesto químico que tiene muchas aplicaciones en diversas disciplinas. Como agente humectante en los laboratorios de histología y microscopía o también se emplea en disolución diluida para humectar durante algunos protocolos de tinción.

4.1.5.2 FÁRMACOS

- Sugamadex obtenido de Merck Millipore Products, Sharp & Dohme (Madrid, España). La Comisión Europea emitió una autorización de comercialización válida para toda la Unión Europea para el uso en humanos de Sugamadex en Julio de 2008 (EMA, 2008).

4.1.6 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

4.1.6.1 MICROSCOPIA CONFOCAL

El principio del funcionamiento de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera del foco, iluminando una pequeña zona de muestra. El microscopio consta de las siguientes partes:

- Dos diafragmas (pinhole), uno entre la fuente de la luz y el objetivo y otro entre el objetivo y el detector. Ambos se encuentran perfectamente alineados, de forma que solamente el segundo deja pasar la luz del plano focal al detector.
- Laser como fuente de luz que permite focalizar la iluminación en una región más pequeña de la muestra con gran intensidad.
- Sistema de barrido, beam scanning, donde la muestra se desplaza por la muesca o stage scanning sin que el haz se desplace y permanezca inmóvil.

Se logran imágenes en diferentes planos focales y es posible aplicar técnicas de reconstrucción 3D que permiten visualizar las estructuras.

El microscopio utilizado en este trabajo ha sido el Laser Confocal Leica TCS SP2 de Leica Microsystems.

4.1.6.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

En la técnica de inmunofluorescencia se utiliza un microscopio que consta de las siguientes partes:

- Fuente de luz ultravioleta y de luz visible.
- Uno o varios filtros de excitación o filtros primarios, que seleccionan la longitud de onda de la luz que incide sobre la muestra.
- Filtro secundario o de barrera, que selecciona las longitudes de onda emitidas dentro del espectro visible, dejando pasar solo la luz emitida por la sustancia fluorescente e impidiendo el paso de la luz excitadora.

Las principales técnicas de inmunofluorescencia son el tipo directo y el indirecto:

- Técnica de inmunofluorescencia directa: se utiliza un anticuerpo (Ac) específico frente al antígeno (Ag) que se desea detectar, conjugado a un fluorocromo (elemento/compuesto de fluorescencia).
- Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI): se emplea en un primer paso el anticuerpo específico no marcado, y en un segundo paso un anticuerpo marcado con el correspondiente fluorocromo que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario. Es más sensible y resulta muy útil para detectar, en el suero de pacientes, determinados tipos de anticuerpos que son capaces de reaccionar con antígenos presentes en los propios tejidos.

Otras técnicas de inmunofluorescencia (IF) son:

- la técnica sándwich, para detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas ante un determinado antígeno en las células plasmáticas en tejidos de un animal previamente inmunizado con este antígeno.
- La técnica de incubación con complemento es una modificación de la técnica indirecta y en ella el anticuerpo que se emplea en el primer paso de la técnica ha de ser capaz de fijar el complemento.

El microscopio de fluorescencia utilizado en este trabajo fue un Diaphot 300 (Nikon®, Tokyo, Japan).

4.1.7 CULTIVO PRIMARIOS

4.1.7.1 CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS

Para los cultivos primarios de neuronas corticales, se extrajeron cortezas cerebrales obtenidas en condiciones estériles. Posteriormente se diseccionaron y disociaron mecánicamente mediante pipeteo durante 10 minutos con DMEM (10 ml para la totalidad de los 12-14 fetos obtenidos a los 14-15 días fetal).

La suspensión celular se filtró a través de una malla de nilón de un poro de 90 μm de diámetro, eliminando capilares sanguíneos y agregados celulares. La suspensión celular se colocó en placas que previamente se habían revestido con la solución de poly-D-lisina (PDL) (5×10^4 células/ cm^2) para permitir la adhesión de las neuronas.

Después de la adhesión de las células (1h), el medio se cambió a DMEM pH 7.4, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 10mM HEPES, 40mM NaHCO_3 , 100 unidades/ml penicilina, y 100 mg/ml estreptomicina.

El cultivo de neuronas se dejó crecer en una atmosfera de 5% CO_2 y 95% O_2 , a 37°C, durante 3 días. Posteriormente, el cultivo se expuso al toxico citosina- β -D-arabinofuranosido-hidroclorido (10 μM), durante 24h, para prevenir la proliferación de células no neuronales, debido a que este tóxico es eficiente para destruir células en proliferación.

4.1.7.2 CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS

Los cultivos primarios de astrocitos corticales se llevaron a cabo a partir de cortezas cerebrales de fetos de 21 días de gestación, bajo condiciones de esterilidad libres de toxinas y fueron diseccionadas y disociadas mecánicamente por pipeteo de 10 veces con DMEM (10 ml del córtex obtenidos de los 12-14 fetos). La suspensión celular se filtró a través de una malla de nilón con un poro de 90 μm de tamaño.

Las células se colocaron en placas (5×10^4 células/ cm^2) con solución SBF a 20%, 10mM HEPES (titration $\geq 99.5\%$), 40mM NaHCO_3 , 100 unidades/ml penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina.

Después de 4 días, el medio se cambió por un medio nuevo preparado tal como se ha indicado anteriormente. A los 7 días de cultivo, el 20% de SBF se cambió a 10% de concentración.

Tanto los cultivos de astrocitos como de neuronas, crecieron en una atmosfera humidificada de 5% CO₂ y 95% O₂, a 37°C, durante todo el tiempo de cultivo.

La posible contaminación de los astrocitos y de las neuronas fue determinada a través de ensayos de inmunofluorescencia (IF) utilizando el anticuerpo monoclonal anti-proteína ácida fibrilar de la glía (Anti-GFAP), marcador de astrocitos (1:500) y el anticuerpo (clone G-A-5) y el policlonal de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2), marcador neuronal (1:500). Bajo estas condiciones aproximadamente el 99%±3 de las células del cultivo eran neuronas y en el cultivo de astrocitos aproximadamente el 95% ± 4 de las células eran astrocitos.

4.2 MÉTODO

4.2.1 INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Las neuronas creciendo en monocapas y en cristales de 16-mm se usaron para estudios de inmunofluorescencia siguiendo el procedimiento descrito por Vallés y sus colaboradores (Vallés et al., 2008). Los anticuerpos monoclonales anti-MAP-2 y anti-GFAP se usaron para detectar la pureza de los cultivos. La incubación se realizó a 37°C durante 60 min. Después de diversos lavados con tampón fosfato salino (PBS), las células se incubaron con el anticuerpo secundario y cuando fue necesario, el núcleo se tiñó con (0.5 µg/ml) de tinción Hoechst 33342 durante 5 min. En otros experimentos, los astrocitos fueron incubados con mitotracker® y Hoechst 33342 y las neuronas simultáneamente con Anexina V, Hoechst 33342 y Rodamina para ver apoptosis y necrosis.

4.2.2 ENSAYO DE MTT Y DE LA ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA

La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol) y normalizada con células control con una viabilidad del 100%. Las sales de tetrazolio son especialmente útiles para ensayos de cuantificación de células viables porque la conversión de sales de tetrazolio (amarillo y soluble) a cristales de formazan (púrpura e insoluble) solo se puede producir por la activación de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. A pesar de que el método MTT posee limitaciones debidas al estado fisiológico de las células y a la variabilidad de la actividad deshidrogenasa mitocondrial en diferentes tipos de células, es un método útil para la determinación del crecimiento celular y de la toxicidad celular (Denizot & Lang., 1986; Carmichael et al., 1987). Este método permite medir supervivencia y proliferación celular, así como también, determinar la citotoxicidad de potenciales agentes terapéuticos.

La viabilidad celular también se midió mediante la liberación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), (actúa al final de la glicolisis), al medio de cultivo. En controles fue siempre >90%. La muerte celular o citotoxicidad es determinada mediante la evaluación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima estable normalmente presente en el citosol de todas las células, la cual es rápidamente liberada al exterior cuando hay daño celular.

La actividad de la LDH puede ser determinada mediante una reacción enzimática en la cual la LDH oxida el lactato dando piruvato, el cual reacciona luego con una sal de tetrazolio convirtiéndola en formazán. El incremento en la cantidad de formazán producido en el sobrenadante del cultivo se correlaciona directamente con el número de células muertas. El formazán es soluble en agua y puede ser detectado midiendo su absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro.

4.2.3 WESTERN-BLOT

Las células adheridas se recogieron y se les añadió tampón frío con (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 19% glicerol, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorado, 1µg/ml leupeptina, 1µg/ml aprotinina, y 1µg/ml pepstatina), pH 7.4. Fueron disgregadas con ciclos repetidos de congelación y calentamiento y hervidas durante 5 min a 90°. El extracto celular se homogeneizó y centrifugó (10000 x g durante 10 min a 4°C). El sobrenadante resultante fue usado para el análisis de Western-blot. La concentración de proteínas se determinó usando el método modificado de Lowry. Las proteínas se separaron mediante geles de SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa usando técnicas estándar (Fig.35).

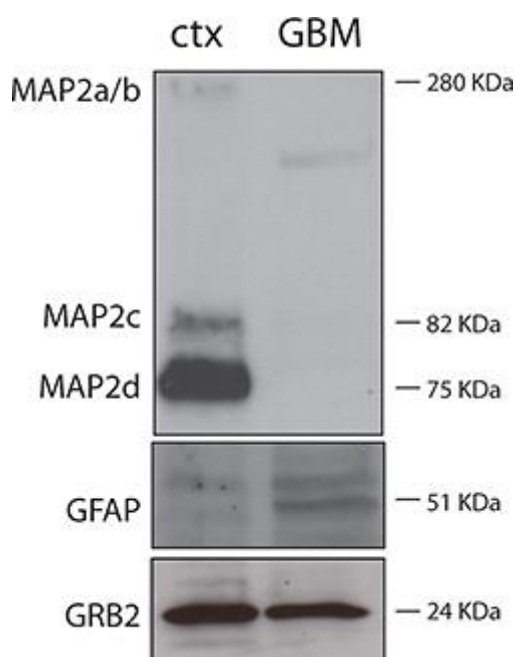


Figura 35: Detección de proteínas de células neuronales mediante Western Blot.

Fuente: Pacifici & Peruzzi (2012).

Las membranas se bloquearon con 5% de leche en TBS conteniendo 0.05% de Tween-20 e incubadas con los correspondientes anticuerpos siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces con TBST (Tris-borato EDTA con 0.2% Tween 20) durante 15 min y luego incubadas por 1 h con el anticuerpo secundario IgG unido a peroxidasa anti-ratón o anti-conejo (Cell Signaling Technologies, Barcelona, España). ECL se usó para el desarrollo de las señales auto-radiográficas que se analizaron usando un densitómetro escáner de la marca Bio-Rad.

4.2.4 ENSAYO TUNEL

Las células apoptóticas se analizaron mediante la medición del ADN fragmentado en un ensayo TUNEL estándar siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se permeabilizaron con 0.1% Triton X-100 durante 2 min en hielo, reactivadas con la enzima TdT y teñidas con FITC-dUTP durante 1 h a 37°C en oscuridad. Las células positivas a TUNEL se vieron mediante microscopía de fluorescencia (FII) y las células con fluorescencia verde fueron definidas como apoptóticas.

4.2.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3

La actividad de la Caspasa 3 fue medida en fracciones citosólicas (como se indica en el apartado 4.1.6) usando un substrato colorimétrico de alta sensibilidad, N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Calbiochem, La Jolla, CA). La actividad enzimática se calculó en pmol/min.

4.2.6 FRACCIONAMIENTO SUB-CELULAR, CUANTIFICACIÓN COLESTEROL

Las neuronas corticales cultivadas se fraccionaron para separar el citosol y la fracción membranosa. Brevemente, las células recolectadas mediante adición de 5 mM EDTA en PBS, se centrifugaron durante 10 min a 1000 x g a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en 200 µl de tampón de fraccionamiento (0.25 M sucrosa, 1 mM cloruro de Mg, 2 mM EGTA y 25 mM HEPES, pH 7.4) y lisado mediante tres ciclos de enfriamiento en nitrógeno líquido.

El lisado fue centrifugado a 100000 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante (fracción citosólica) fue separado y el resto (fracción membranosa) fue disuelto otra vez en 200µl de tampón de fraccionamiento conteniendo 5% Triton X-100 y levemente sonicado. Los lisados celulares completos fueron obtenidos por homogenización de las muestras en tampón de fraccionamiento sub-celular conteniendo 2.5% Triton X-100, seguido por una breve sonicación.

Las neuronas se cultivaron, como anteriormente se indica, con o sin cantidades incrementadas de colesterol soluble y con o sin SUG, los lisados celulares completos y las fracciones celulares, se liofilizaron usando un equipo de congelación y secado de la empresa SP Scientific (Gardiner, NY). Los lípidos se extrajeron y el colesterol fue determinado usando colesterol oxidasa (Heider & Boyett, 1978).

4.2.7 ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR

La muerte celular inducida por SUG (necrosis y apoptosis) se determinó usando microscopía de fluorescencia. Las células convenientemente separadas se incubaron con Hoechst 33342 (10 mM) y Rodamina (10 µg/ml), durante 3 min, y analizadas usando un microscopio de fluorescencia Diaphot 300 con excitación de 360 nm. Los núcleos viables se observaron como núcleos redondos y azules. En la necrosis, los núcleos se detectaron de color rosáceo, mientras que los núcleos de células apoptóticas se detectaron como núcleos azules o rosas fragmentados. Cerca de 1500 células se contaron cada vez.

La rotura de las cadenas de ADN en las células apoptóticas se midió usando el ensayo de marcaje directo TUNEL con el microscopio de fluorescencia siguiendo las instrucciones del fabricante y su metodología (Boehringer, Mannheim, Germany).

4.3 SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo realizando ANOVA de una vía mediante el programa Graphpad Prim 5. Todos los resultados se expresaron como la media \pm desviación estandar (DS). El t-test (Student's t) se usó para dos grupos de análisis. El test de Tukey se usó para el análisis de grupos múltiples. Los resultados se consideraron significativos con una $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 DIFERENCIAS ENTRE CULTIVOS DE ASTROCITOS Y NEURONAS

En las figuras 36 (a, b), 37(a, b) y 38 se muestran las diferencias existentes entre un cultivo de astrocitos y de neuronas, apreciándose la interconectividad mediante sus axones en las neuronas y la morfología característica de los astrocitos. La imagen de neuronas se realizó en campo claro a 10 días de cultivo. La imagen de astrocitos se realizó mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), específica de astrocitos (Fig 36a) y mediante Hoechst 33342 para teñir los núcleos (Fig. 36b), con campo claro (Fig. 37a) y con inmunofluorescencia y marcaje con Hoechst 33342 (Fig. 37b). La figura 38 corresponde a neuronas en cultivo primario en imagen de campo claro.

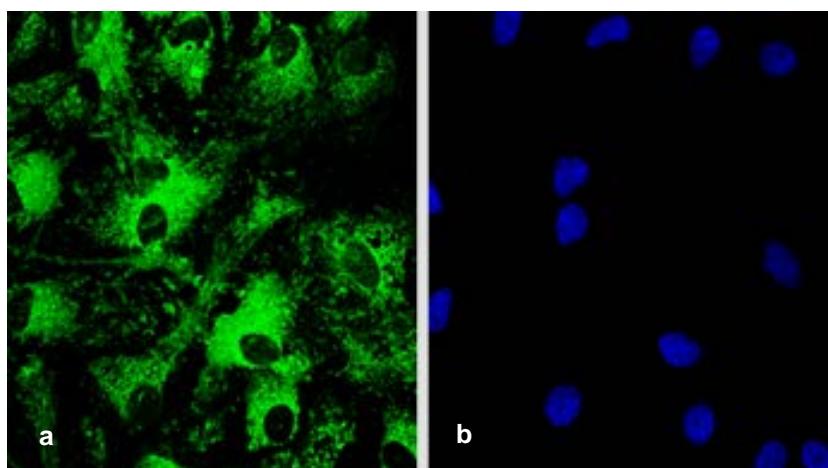


Figura 36 (a, b): Astrocitos en cultivo primario.

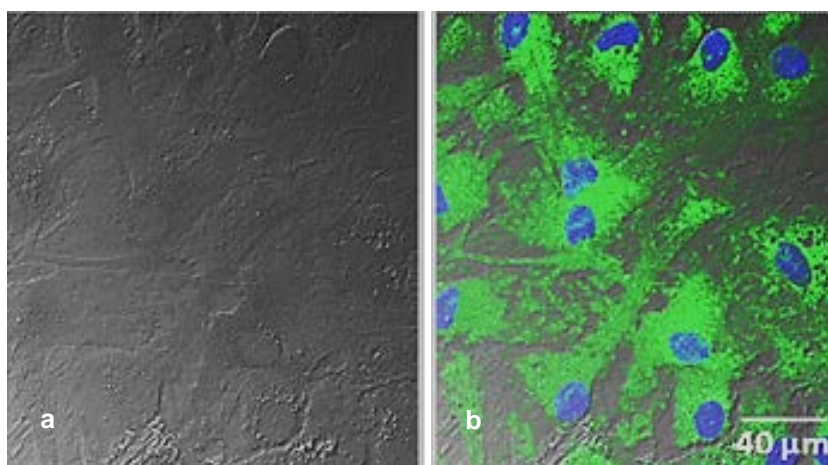


Figura 37 (a, b): Astrocitos en cultivo primario.

Figura 37: (a y b) Astrocitos en cultivo primario. Astrocitos de 10 días de desarrollo.

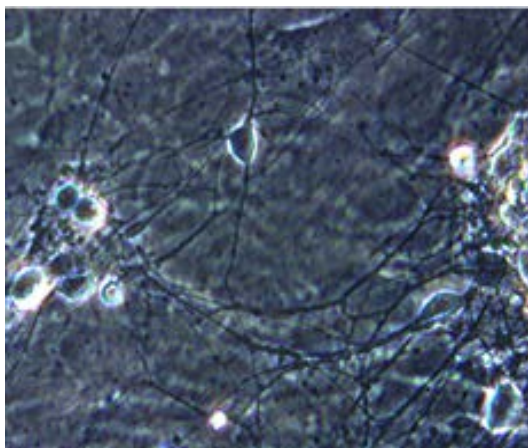


Figura 38: Neuronas en cultivo primario.

Figura 38: Neuronas en cultivo primario a 6 días de desarrollo.

5.2 SUGAMADDEX CAUSA MUERTE NEURONAL

Para determinar si se producía muerte celular en los cultivos primarios de neuronas se utilizó el ensayo MTT usando diferentes concentraciones (37.5, 75 y 150 $\mu\text{g/ml}$ de SUG) y tiempos de tratamientos (0, 6, 12 y 24 h). Los ensayos se iniciaron a los 10 días después del comienzo del cultivo. Correspondería a 10 días de crecimiento neuronal donde las neuronas se encuentran en periodo de diferenciación. En la Figura 39 se puede observar los cambios en la viabilidad celular conforme transcurre el tiempo o se incrementa la concentración de SUG ($*p \leq 0.01$). En la citada figura se aprecia una disminución de la viabilidad celular en relación al tiempo y al incremento de la concentración de la γ -ciclodextrina.

Basándonos en los resultados obtenidos en la Figura 39, seleccionamos la concentración estándar de 75 $\mu\text{g/ml}$ de SUG para la realización de futuros experimentos. A esta dosis observamos muerte celular manteniendo un porcentaje de un 70% de células vivas, lo que nos permitiría la realización de futuras investigaciones con suficiente muestra celular para llevarlas a cabo. A la dosis de 37,5 $\mu\text{g/ml}$, el % de células vivas sería superior al 90% no detectándose en muchos casos las diferencias entre las células control y tratadas. En cambio a 150 $\mu\text{g/ml}$ el % de células vivas es demasiado bajo para poder ser usado en ensayos posteriores.

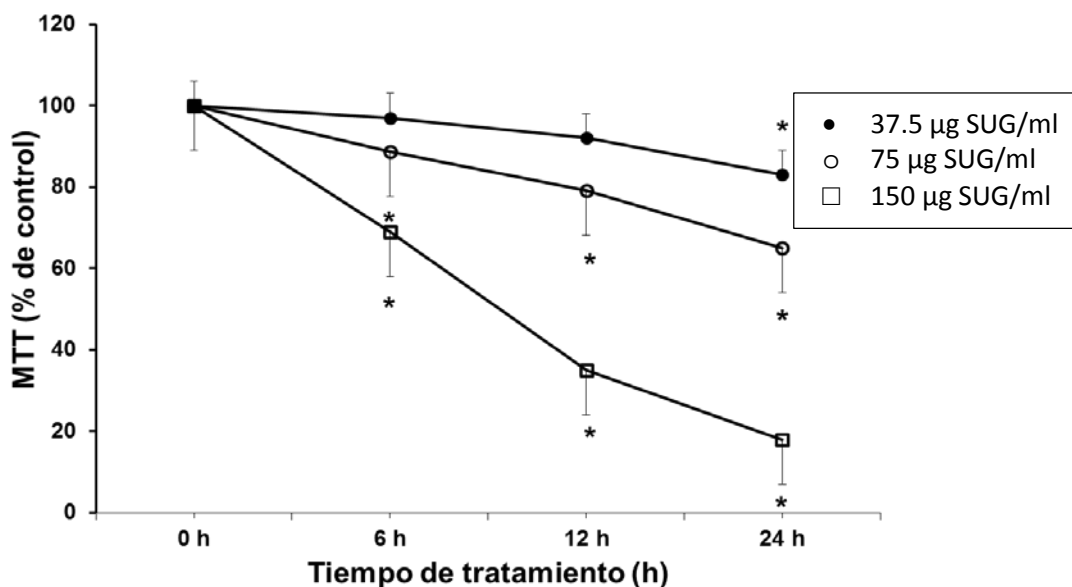


Figura 39: Muerte neuronal inducida por SUG.

Figura 39: La neurotoxicidad se determinó por el ensayo de MTT, analizando la muerte celular dependiendo del tiempo y de la concentración de SUG. (* $p < 0.01$ vs. control). ● (37.5 µg SUG/ml), ○ (75 µg SUG/ml), and □ (150 µg SUG/ml). Tiempos usados 0, 6, 12 y 24 horas.

Sugamadex produce muerte celular detectada mediante microscopía de campo claro en neuronas diferenciadas de 10 días en cultivo primario. En la figura 40 observamos una disminución de neuronas en cultivo primario por la adición de SUG (24 h) (75 µg SUG/ml) comparado con las células control. La fotografía se realizó a 10 nm y midiendo en campo claro, a los 10 días de cultivo.

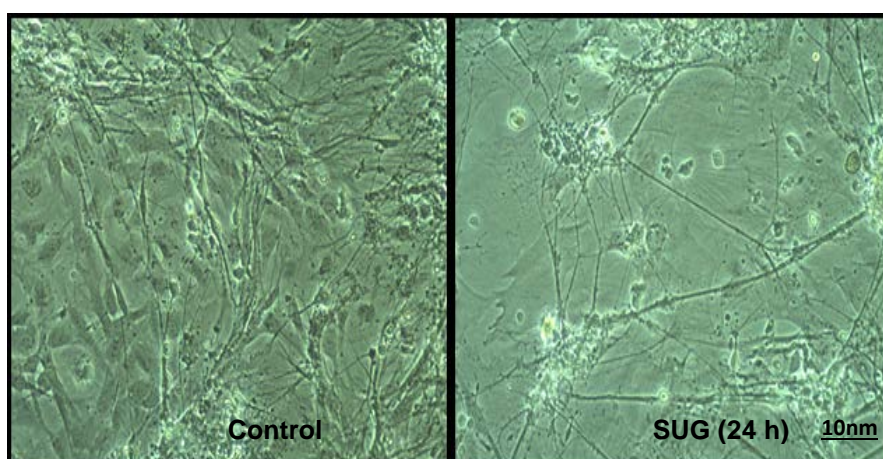


Figura 40: Imagen campo claro de neuronas a los 10 días de cultivo.

Figura 40: Control y con SUG (24 h) a concentración de 75 µg SUG/ml. El % de las células viables controles fue siempre $\geq 95\%$

Con el fin de detectar si el SUG tenía algún efecto sobre las células no diferenciadas (Stem Cells), se añadió SUG durante 24h a dosis de 75 $\mu\text{g/ml}$ a neuronas de 4 días de cultivo. En la figura 41, observamos una disminución de las conexiones interneuronales en las neuronas tratadas con SUG comparadas con las neuronas control. La fotografía se realizó a 20 nm y midiendo las células en campo claro (Fig.41).

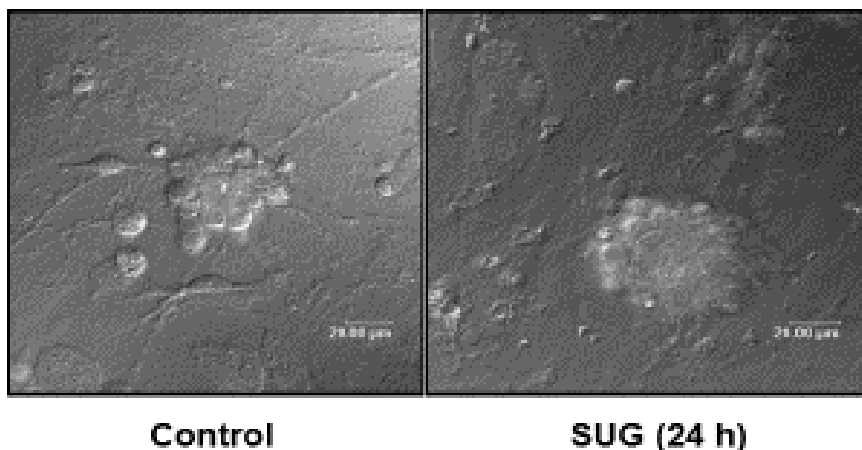


Figura 41: Campo claro de neuronas en cultivo primario a 4 días de incubación.

Figura 41: Disminución de las conexiones interneuronales ocasionada por SUG (75 $\mu\text{g/ml}$) comparando con control. Cultivo a 4 días de crecimiento.

5.3 MUERTE NEURONAL POR APOPTOSIS Y NECROSIS EN NEURONAS

Usando técnicas de inmunofluorescencia con Hoechst 33342 para detectar núcleos, Anexina V para detectar apoptosis y Rodamina para detectar necrosis, en la figura 42 se aprecia un aumento en la apoptosis y la necrosis después de la adición de SUG comparado con las neuronas control (neuronas a 10 días de cultivo).

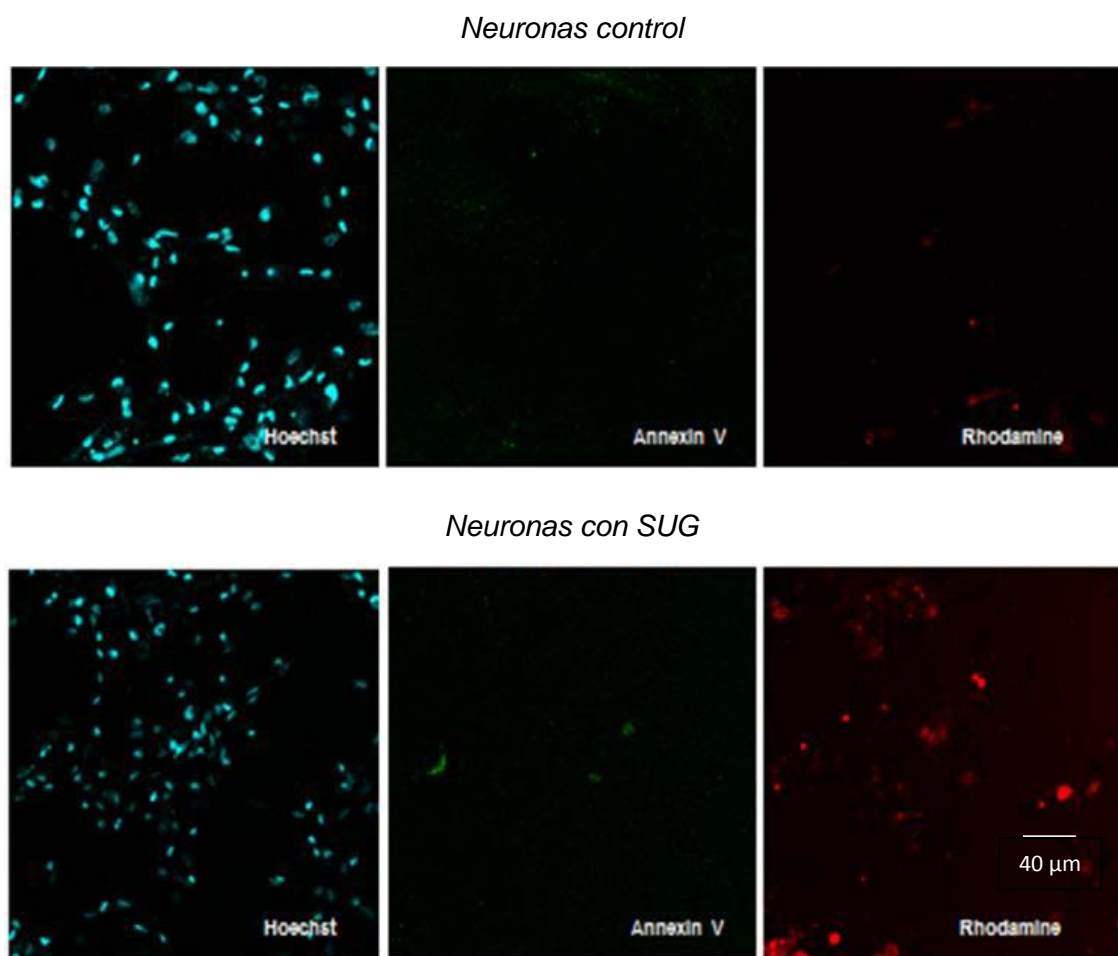


Figura 42: Inmunofluorescencia con Hoechst 33342, Anexina V y Rodamina.

Figura 42: Inmunofluorescencia de neuronas a 10 días de cultivo (control y tratadas con SUG 75 $\mu\text{g/ml}$) midiendo Hoechst 33342 para detectar núcleos, Anexina V para detectar apoptosis y Rodamina para detectar necrosis. Usando 40 μm en la imagen.

5.4 MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR SUGAMADEX

En la tabla 9 observamos que el número total de neuronas muertas fue significativamente mayor en presencia de la γ -ciclodextrina respecto al control. Este dato nos indica que la muerte celular puede ser el efecto predominante causado por el sugamadex. En el caso de las células control el porcentaje de células muertas por apoptosis es similar al de células muertas por necrosis, mientras que en el grupo tratado con sugamadex la apoptosis produjo un porcentaje mayor (87.7%) de muerte celular con respecto a la necrosis que fue de un 12.3% (Tabla 9).

El porcentaje de células apoptóticas obtenidas usando Hoechst 33342 e ioduro de propidio o usando técnicas de TUNEL fue similar. Durante el periodo de 48 h en presencia de la γ -ciclodextrina, cerca del total de las células no viables (94.7 + 3.9 %) perdieron su adhesión a las placas de cultivo y fueron progresivamente recuperadas en el medio de cultivo.

PARAMETROS	NO ADICIÓN	SUGAMADEX
10^{-4} x número de células muertas /ml	2,1 ± 0,7	8,3 ± 2,3*
Células necróticas (%)	46,6 ± 7,5	12,3 ± 4,4*
Células apoptóticas (%)	53,4 ± 9,3	87,7 ± 10,6*
*p < 0.05 sugamadex vs control.		

Tabla 9: Tipo de muerte neuronal inducido por SUG.

Tabla 9: Muerte neuronal. Parámetros medidos: 10^{-4} x número de células muertas/ml, células necróticas (%) y células apoptóticas (%) sin adición y con adición de SUG. *p < 0.05 sugamadex vs control.

5.5 APOPTOSIS, SUG Y CAMBIOS EN LOS NIVELES DE COLESTEROL

Para comprender mejor los mecanismos responsables de la activación de la apoptosis inducida por SUG, evaluamos si esta γ -ciclodextrina puede causar alteraciones en los niveles de colesterol y si este dato puede estar ligado a la apoptosis. Como se aprecia en la Tabla 9, fracciones sub-celulares revelaron que el SUG disminuyó los niveles de colesterol citosólicos, de membrana y mitocondriales.

Los niveles de colesterol en la célula completa se encuentran disminuidos significativamente con respecto a los niveles control en las neuronas, células endoteliales y leucocitos. Analizando los datos en la membrana plasmática hay una disminución significativa en todos los tipos celulares incluso en astrocitos.

La Tabla 10 también nos indica la medición de muerte celular mediante el ensayo de MTT, donde únicamente en neuronas se aprecia una disminución de la viabilidad celular de manera significativa producida por SUG.

	Colesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)				MTT	
	Célula completa		Membrana plasmática		(% control)	
	- SUG	+ SUG	- SUG	+ SUG	- SUG	+ SUG
Neuronas	30.3 \pm 3.7	18.5 \pm 2.7*	67.4 \pm 5.9	35.1 \pm 4.7*	100 \pm 2	65 \pm 7*
Astrocitos	51.7 \pm 8.2	40.1 \pm 5.3	215.6 \pm 26.5	177.4 \pm 10.2*	100 \pm 8	92 \pm 10
Células Endot.	42.4 \pm 3.9	31.7 \pm 3.9*	137.3 \pm 19.2	116.7 \pm 8.7*	100 \pm 3	99 \pm 12
Leucocitos	29.6 \pm 4.4	20.1 \pm 3.5*	176.6 \pm 15.2	139.3 \pm 9.5*	100 \pm 9	97 \pm 13

Tabla 10: Efecto del Sugamadex

Tabla 10: Efecto de Sugamadex en el contenido celular y de membrana del colesterol y en la viabilidad celular (MTT) en diferentes tipos celulares. *p < 0.05 vs control.

5.5.1 COLESTEROL Y MUERTE CELULAR INDUCIDA POR SUGAMADEx

Como se aprecia en la Tabla 11 el tratamiento con SUG produce una disminución significativa de los niveles de colesterol (36.6 ± 5.1) comparado con las neuronas control (62.2 ± 3). Además, la presencia de SUG+colesterol devolvió los niveles de colesterol en membrana plasmática (60.5 ± 6.9) a los valores control.

Tratamiento	Colesterol en Membrana Plasmática ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	MTT (% Control)
No	62.2 ± 3	100 ± 3
SUG	$36.6 \pm 5.1^*$	$63 \pm 6^*$
Colesterol	$83.7 \pm 7.9^*$	102 ± 2
SUG + Colesterol	60.5 ± 6.9	97 ± 3

Tabla 11: Efectos en membrana plasmática.

Tabla 11: Efecto en la membrana plasmática del colesterol sobre la muerte neuronal inducida por SUG. * $p < 0.05$ vs control.

5.6 SUGAMADEX Y FACTOR INDUCTOR DE LA APOPTOSIS (AIF)

Observando las diferentes señales moleculares en la fase pro-apoptótica (usando técnicas de Western-blot, fig.43), demostramos un aumento significativo de la expresión proteica de AIF después de la adición de SUG comparada con las células control (Fig. 43). La adición de SUG+colesterol redujo la expresión proteica de AIF de manera significativa con respecto a las células tratadas solo con sugamadex.

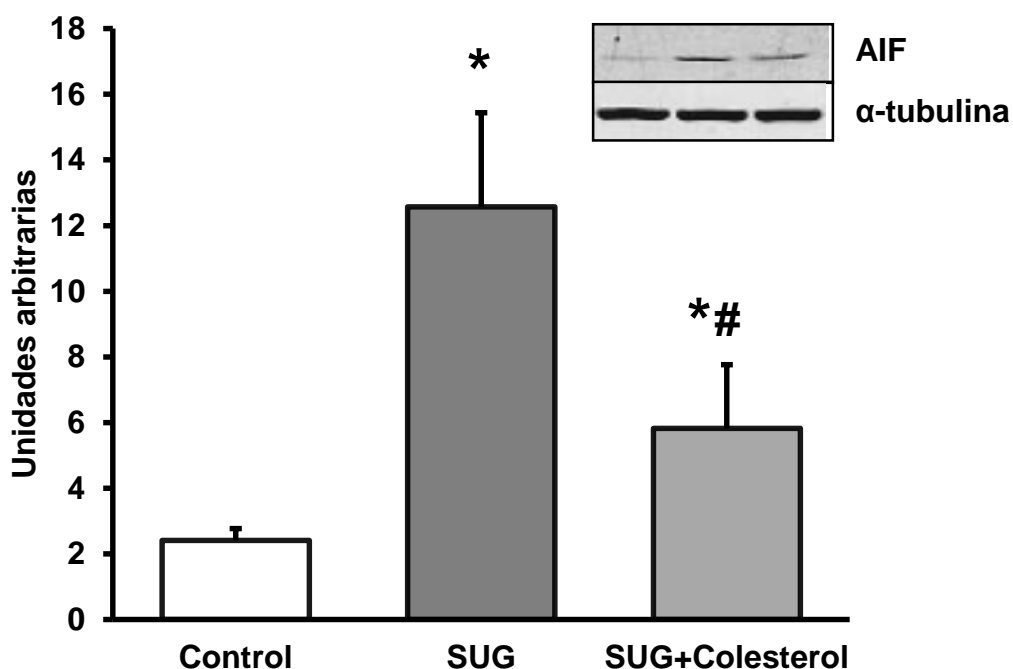


Figura 43: Efecto del SUG y del SUG + colesterol en la expresión proteica de AIF.

Figura 43: Efecto de sugammadex y sugammadex + colesterol en la expresión proteica del factor inductor de apoptosis (AIF). SUG (75 µg/ml) fue añadido al medio de cultivo durante 24 h. La expresión de la proteína AIF fue analizada por Wester-blot. Los resultados expresados, en unidades arbitrarias, representan la media ± DS (barras de error) (n=5). Los datos están normalizados frente a la proteína estándar (α-tubulina). *p ≤ 0.01 vs control. #p ≤ 0.01 comparando SUG + colesterol vs SUG.

5.7 EFECTO DEL SUG Y SUG+COLESTEROL EN EL CITOCROMO C

En Figura 44 se aprecia un aumento en la expresión de la proteína Citocromo c (Cit c) tras la incubación con SUG comparando con las células control. Además la presencia de colesterol con SUG ocasiona una disminución significativa de la expresión de Citocromo c con respecto a las células que solo presentaban SUG, retornando a los niveles control.

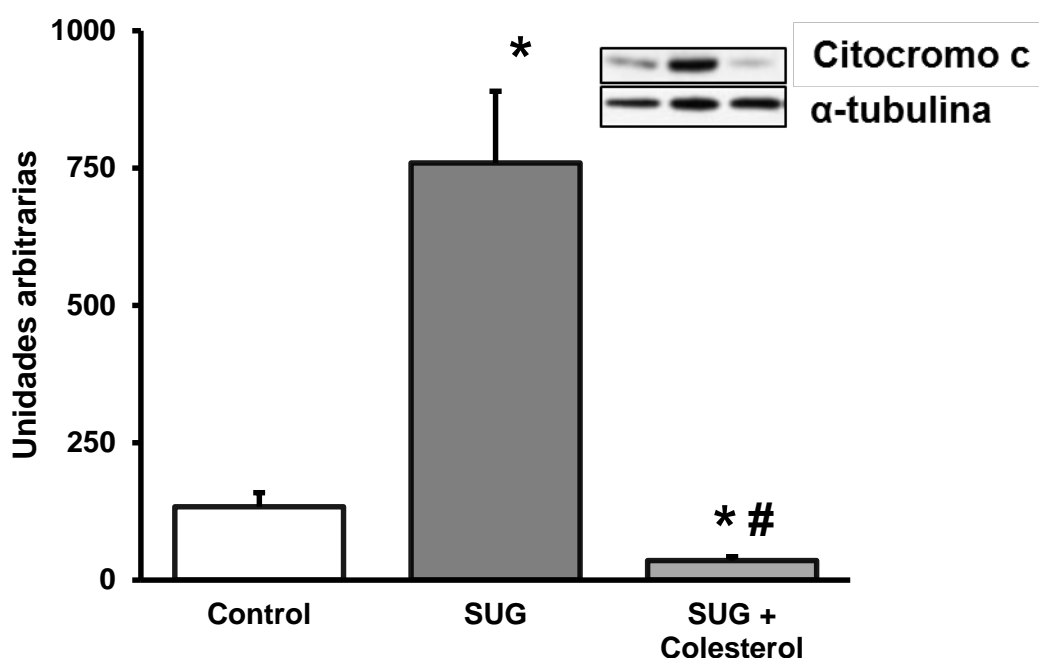


Figura 44: Efecto SUG y SUG + colesterol en la expresión proteica del Cit c.

Figura 44: SUG (75 µg/ml) presente en el medio de cultivo durante 24 h. Cit c fue analizado por Western-blot. Los resultados expresados, en unidades arbitrarias, representan la media ± DS (barras de error) (n=4). Los datos están normalizados frente a la proteína estándar (α-tubulina). *p ≤ 0.01 vs control. #p ≤ 0.01 vs SUG.

5.8 EXPRESIÓN PROTEICA DE SMAC/DIABLO TRAS DE ADICIÓN DE SUG

La proteína Smac/Diablo, al igual que el Citocromo c (Cit c), se libera cuando se inicia la apoptosis en las células debido a la acción citotóxica.

En la figura 45 mostramos que la adición de SUG, a las neuronas en cultivo primario, produce un aumento significativo de la proteína Smac/Diablo. También, la presencia de colesterol en el medio ocasiona una disminución significativa de la proteína con respecto a las neuronas que fueron solo tratadas con SUG, llegando por lo tanto a niveles control (Fig. 45).

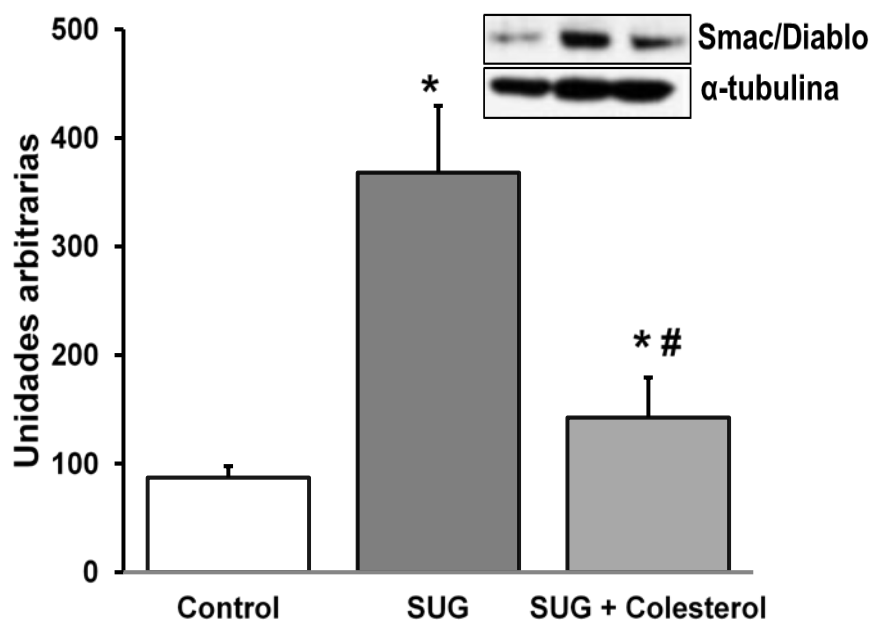


Figura 45: Efecto SUG y SUG + colesterol en la expresión proteica del Smac/Diablo.

Figura 45: SUG (75 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h fue añadido a neuronas en cultivo primario. La proteína Smac/Diablo fue analizada por Western Blot. Los resultados expresados, en unidades arbitrarias, representan la media \pm DS (barras de error) ($n=4$). Los datos están normalizados frente a la proteína estándar (α -tubulina). * $p \leq 0.01$ vs control. # $p \leq 0.01$ vs SUG.

5.9 ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3 EN NEURONAS EN CULTIVO PRIMARIO

La incubación con SUG (75 $\mu\text{g/ml}$) aumentó la actividad de la Caspasa-3 (CASP-3) de manera significativa con respecto a las neuronas control. La adición de colesterol a las células incubadas con SUG, produjo una disminución significativa de la actividad de la CASP-3 con respecto a las células en presencia solo de SUG. Estos datos indican un aumento de apoptosis ante la presencia de SUG en el medio de cultivo de las neuronas (Fig. 46), efecto que se previene con la administración de colesterol.

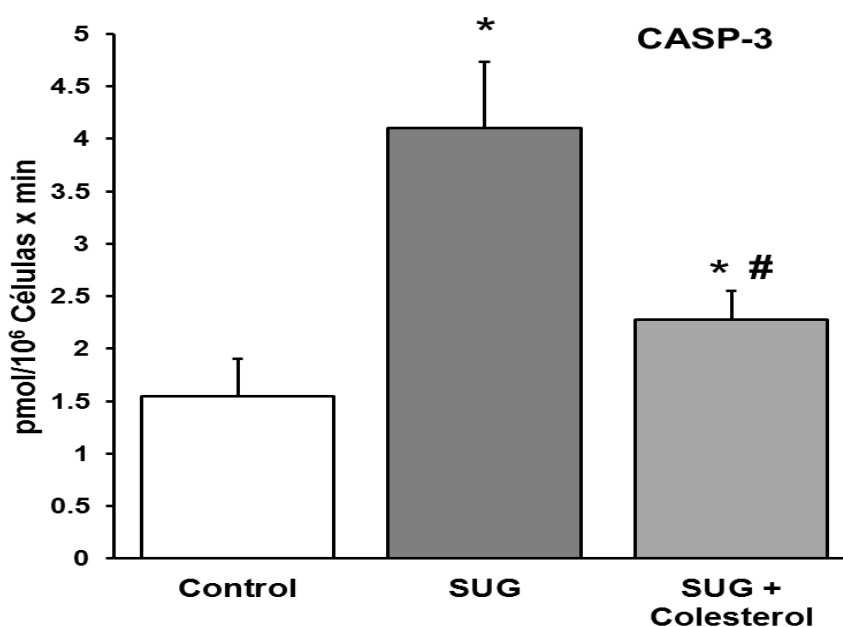


Figura 46: Efecto SUG y SUG + colesterol en la actividad de Casp 3.

Figura 46: SUG (75 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h fue añadido a neuronas en cultivo primario. La actividad de la Caspasa-3 (CASP-3) fue determinada como se indica en material y métodos. Los datos representan la media \pm DS (n=5). *p \leq 0.02 vs control. #p \leq 0.01 vs SUG.

5.10 VIABILIDAD CELULAR DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE ROC, VEC Y SUG.

Para estudiar la viabilidad neuronal ante la presencia de ROC o VEC se utilizó el ensayo MTT. En figura 47, demostramos que la presencia de ROC o VEC no produce cambios significativos en la viabilidad celular comparado con las neuronas control. La presencia de SUG produce una disminución significativa de viabilidad celular comparada con las células control. La presencia de ROC o de VEC en las células que presentaban la γ -ciclodextrina (SUG) previene la disminución en la viabilidad celular inducida por SUG.

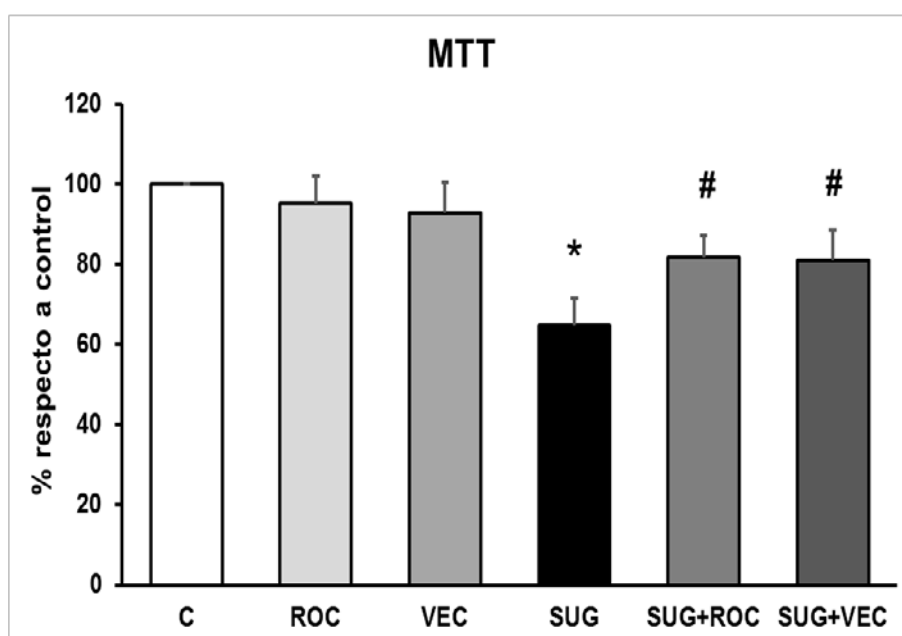


Figura 47: Viabilidad neuronal (MTT) ante la presencia de ROC, VEC y SUG.

Figura 47: SUG (75 $\mu\text{g/ml}$), ROC (2 $\mu\text{g/ml}$) y VEC (0.33 $\mu\text{g/ml}$) fue añadido (24 h) a neuronas en cultivo primario. Los datos representan la media \pm DS (n=4). * $p \leq 0.05$ vs control. # ≤ 0.04 vs SUG.

5.11 DETERMINACIÓN DE ENZIMA LDH. ACCIÓN DE SUG, ROC Y VEC

Las neuronas se incubaron con SUG durante 24 h con el fin de determinar la enzima LDH que nos indica la citotoxicidad producida con las diferentes sustancias analizadas. En este ensayo se produjo un aumento significativo de la actividad de LDH de alrededor de un 61,2% comparado con las células control. La adición de ROC o VEC previene, por lo tanto, el efecto deletéreo del SUG devolviendo los niveles de LDH a los niveles control. Este dato indica un efecto protector del ROC o del VEC frente a la muerte celular inducida por SUG (Fig. 48).

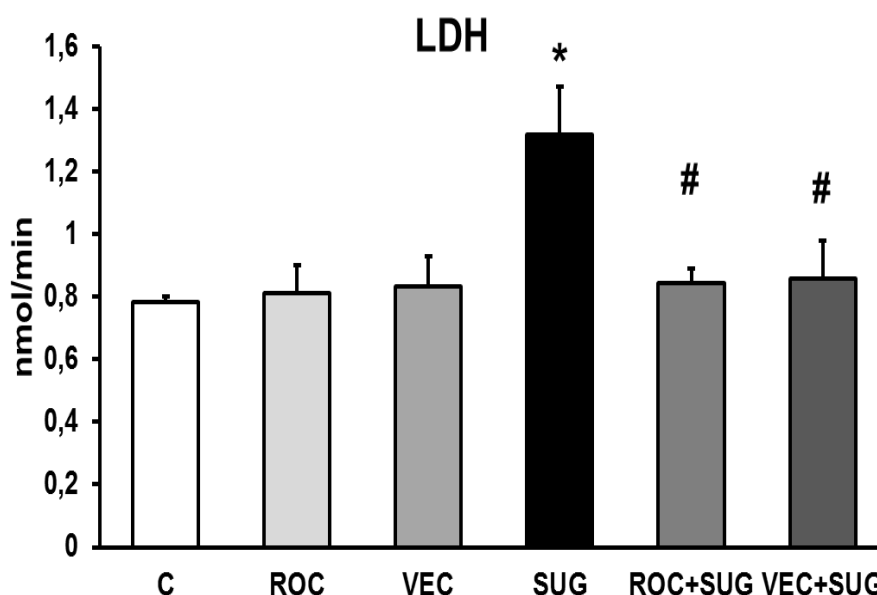


Figura 48: Actividad de la LDH en cultivos primarios de neuronas.

Figura 48: Actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa en neuronas en cultivo primario. Las células se cultivaron en presencia de ROC (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y VEC (0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ROC (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), SUG (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$), SUG+ROC y SUG+VEC. Los datos indican la media \pm DS (n=4). * $p < 0.02$ vs control. # < 0.04 vs SUG.

5.12 NEURONAS INCUBADAS CON SUG, ROC Y VEC CON M.O.

Usando la técnica de microscopía óptica fuimos capaces de detectar una disminución en el número de células después de la incubación con SUG (75 µg/ml) durante 24 h cuando comparábamos con células control (Fig. 49).

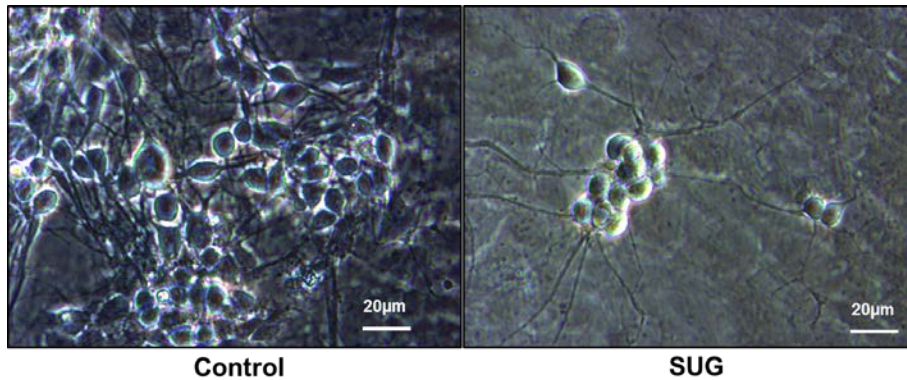


Figura 49: Microscopía óptica de neuronas en cultivo primario (10 días de cultivo).

Figura 49: Neuronas de 10 días de cultivo con microscopía óptica: control y con SUG (75 µg/ml) durante 24 h.

La figura 50 nos muestra que en las células incubadas con ROC+SUG (2 µg/ml + 75 µg/ml respectivamente) no se detectó muerte celular a diferencia de las incubadas sólo con SUG y por lo tanto se aprecia mayor número de células comparado con el control.

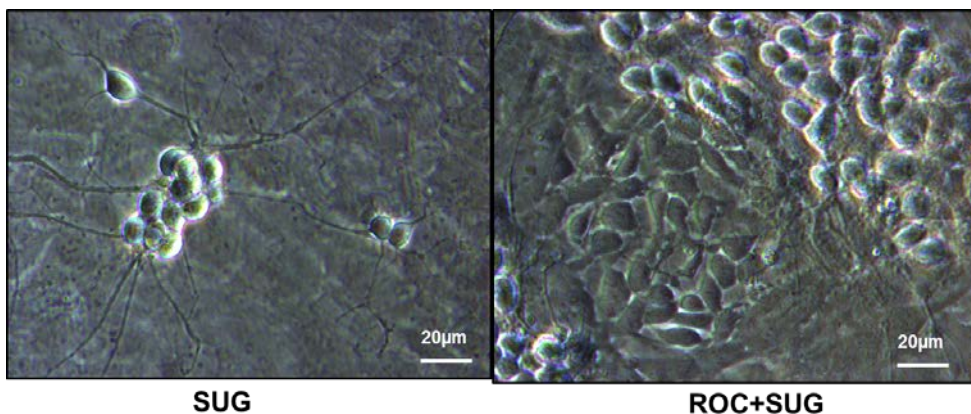


Figura 50: Microscopía óptica de neuronas en cultivo primario (10 días de cultivo).

Figura 50: Neuronas de 10 días de cultivo con microscopía óptica: SUG (75 µg/ml) y SUG + ROC (2 µg/ml) durante 24 h.

Del mismo modo que la figura 51 cuando incubábamos con VEC+SUG (0.33 $\mu\text{g/ml}$ + 75 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) se detectó menor muerte celular comparado con los cultivos solo con SUG (75 $\mu\text{g/ml}$).

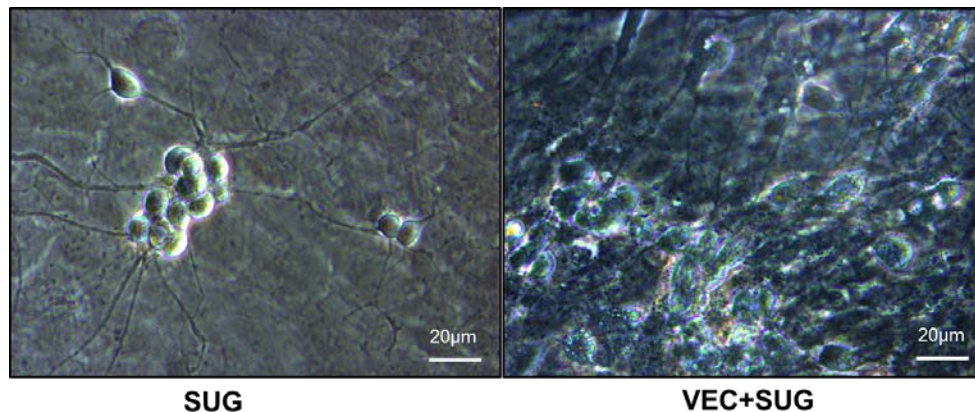


Figura 51: Microscopía óptica de neuronas en cultivo primario (10 días de cultivo).

Figura 51: Neuronas de 10 días de cultivo con microscopía óptica: SUG (75 $\mu\text{g/ml}$) y SUG + VEC (0.33 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h.

5.13 ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3 TRAS ADICIÓN DE ROC, VEC Y SUG

La presencia de SUG produjo un aumento significativo de la actividad de la Caspasa 3 desde un valor control de 3,5 pmol/10⁶ células x min hasta un valor de 6,89 pmol/10⁶ células x min, para las células con SUG. Este dato nos indica un incremento significativo en la apoptosis después de la incubación con SUG. La presencia de ROC o VEC previene el aumento de la actividad de la Caspasa 3 producida por SUG (Fig. 52) indicando una reducción de la muerte celular por apoptosis cuando en el medio se encuentra ROC o VEC.

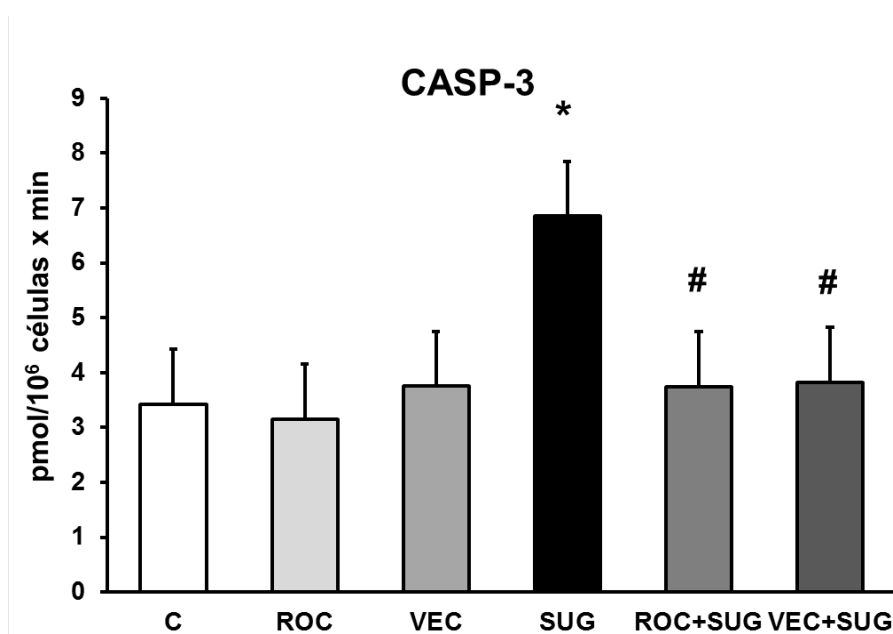


Figura 52: Actividad de la Caspasa 3 en neuronas en cultivo primario.

Figura 52: Las células se cultivaron en presencia de ROC (2 µg/ml), VEC (0.33 µg/ml), SUG (75 µg/ml), SUG+ROC y SUG+VEC. Los datos indican la media ± DS (n=4). *p < 0.02 vs control. # < 0.04 vs SUG.

5.14 EXPRESIÓN DE SMAC/DIABLO EN NEURONAS EN CULTIVO PRIMARIO EN PRESENCIA DE ROC, VEC Y SUG

En la figura 53 la presencia de ROC o VEC no produjo diferencias significativas con respecto a las células control. En cambio la ciclodextrina, SUG, produjo un aumento significativo de la proteína Smac/Diablo desde 20 unidades arbitrarias (control) hasta 45 unidades (Fig. 53). La presencia de ROC o VEC impidió el incremento de expresión proteína Smac/Diablo inducida por SUG.

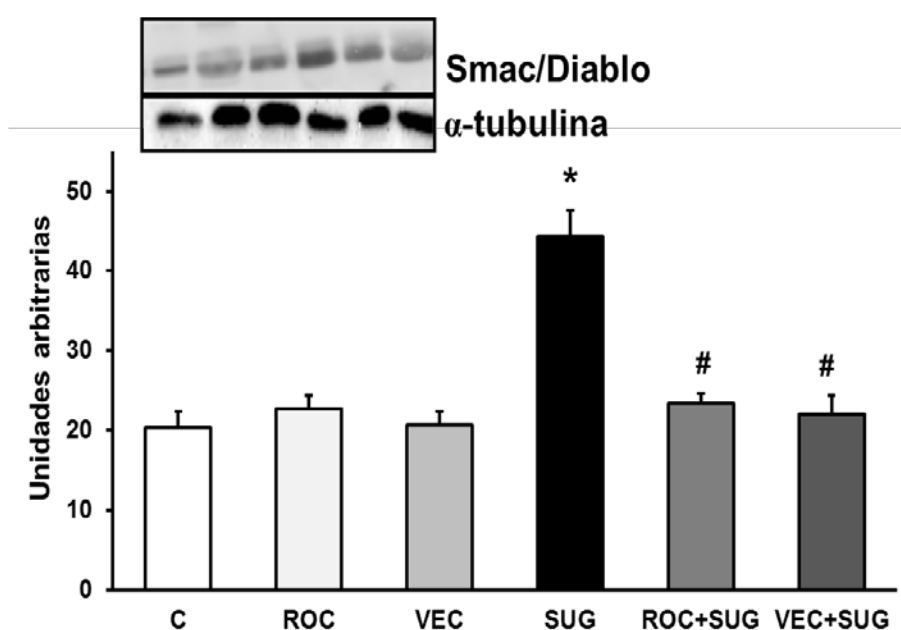


Figura 53: Expresión de la proteína Smac/Diablo en neuronas en cultivo primario.

Figura 53: Las células se cultivaron en presencia de ROC (2 µg/ml), VEC (0.33 µg/ml), SUG (75 µg/ml), SUG+ROC y SUG+VEC. Los datos están normalizados frente a la proteína estándar (α-tubulina). Los datos indican la media ± DS (n=3). *p < 0.04 vs control. # < 0.04 vs SUG.

Debido a que Smac/Diablo es una proteína que se une a los miembros de la familia IAP's (proteínas inhibidoras de la apoptosis) neutralizando su actividad antiapoptótica y al hecho de que Smac/Diablo es producido por la mitocondria, decidimos analizar si otra proteína apoptótica también producida por la mitocondria, como es el Citocromo c pudiera estar implicada en la muerte celular detectada en nuestros ensayos.

5.15 EXPRESIÓN DE CITOCROMO C EN NEURONAS EN CULTIVO PRIMARIO EN PRESENCIA DE ROC, VEC Y SUG

La presencia de ROC o VEC en el medio de cultivo no produjo cambios significativos en la expresión de Citocromo c con respecto a las células control. El SUG produjo un aumento significativo de la expresión de Citocromo c comparando los datos con las neuronas control (Fig. 54). La incubación con ROC o VEC junto con SUG evitó la sobreexpresión de esta proteína inducida por SUG.

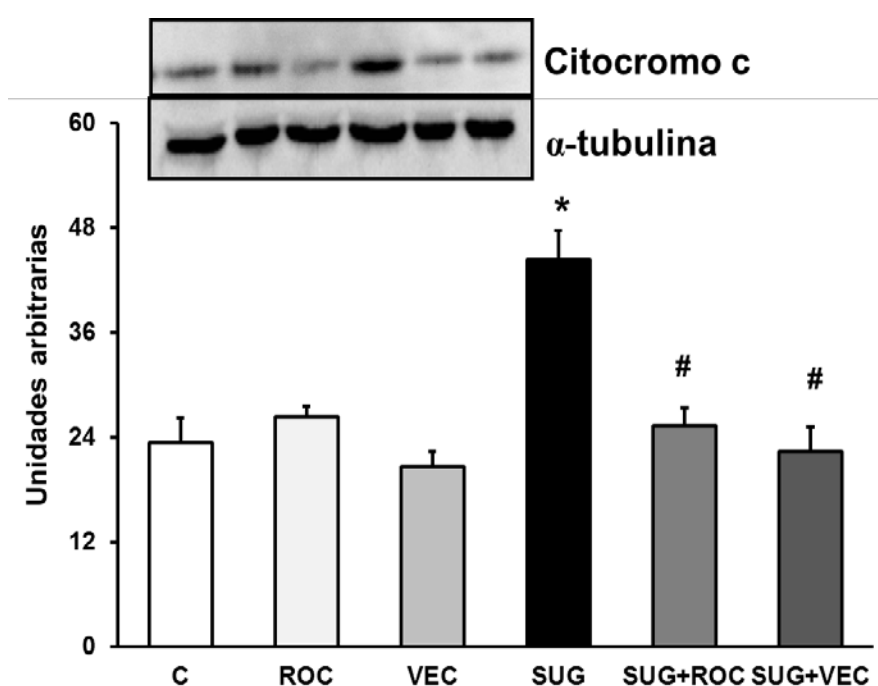


Figura 54: Expresión de la proteína Citocromo c en neuronas en cultivo primario

Figura 54: Las células se cultivaron en presencia de ROC (2 μ g/ml), VEC (0.33 μ g/ml), SUG (75 μ g/ml), SUG+ROC y SUG+VEC. Los datos están normalizados frente a la proteína estándar (α -tubulina). Los datos indican la media \pm DS (n=3). *p < 0.03 vs control. # p < 0.03 vs SUG.

5.16 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AIF EN NEURONAS EN CULTIVO TRAS LA ADICIÓN DE ROC, VEC Y SUG

La presencia de ROC o VEC no produjo cambios significativos con respecto a las células control. La adición de SUG produjo un aumento en la expresión de la proteína AIF como demostramos en la figura 55, si se compara con las neuronas control. La presencia de ROC o VEC eliminó los efectos del SUG sobre la expresión de la proteína AIF.

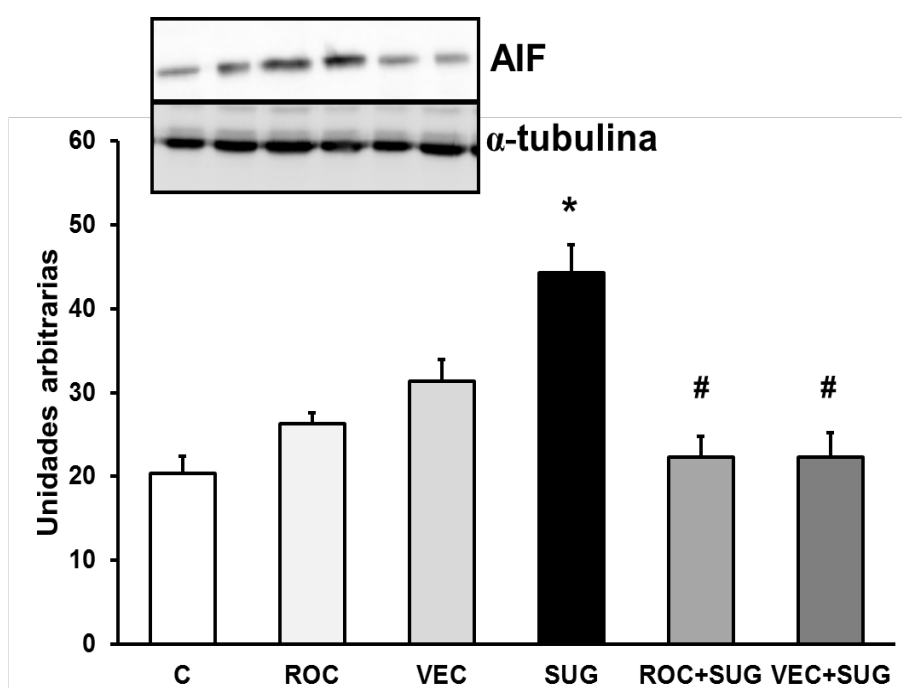


Figura 55: Expresión de la proteína AIF en neuronas en cultivo primario.

Figura 55: Las células se cultivaron en presencia de ROC (2 μ g/ml), VEC (0.33 μ g/ml), SUG (75 μ g/ml), SUG+ROC y SUG+VEC. Los datos están normalizados frente a la proteína estándar (α -tubulina). Los datos indican la media \pm DS (n=4). *p \leq 0.05 vs control. # p \leq 0.05 vs SUG.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Los fármacos BNMND se utilizan durante las intervenciones quirúrgicas para facilitar la relajación muscular en la intubación endotraqueal y en la ventilación artificial para asegurar la inmovilización del paciente y facilitar las intervenciones quirúrgicas (Claudius et al., 2009).

La principal ventaja del fármaco SUG es revertir la acción de los BNMND sin depender de la inhibición de la acetilcolinesterasa. La molécula amino-esteroidea anclada al núcleo lipofílico del SUG no está disponible para unirse con el receptor de la acetilcolina en la unión neuromuscular (Adam et al., 2002). Por esta causa se evita el uso de medicamentos anticolinesterásicos, que producen inestabilidad vegetativa, tales como la neostigmina, que tienen que ser coadministrados con antimuscarínicos como la atropina (Darias et al., 2014).

Anteriormente no existía otra alternativa de elección, se usaba o bien suxametonio o la neostigmina, cuando se requería una respuesta rápida en un tiempo corto para la relajación muscular (Veiga-Ruiz et al., 2008). Sin embargo el suxametonio no ha sido el fármaco ideal ya que posee efectos secundarios indeseables como anafilaxia, aumento de los niveles séricos de potasio y diferentes respuestas cardiovasculares, así como recopilación de sus numerosas reacciones adversas. Dado que altas dosis de ROC tiene un inicio razonablemente rápido y puede ser revertido por SUG, pudo ser potencialmente usado en sustitución de los fármacos anteriormente mencionados (Yang & Keam, 2009).

Los resultados presentados en esta tesis indican una toxicidad potencial del SUG en las neuronas en cultivo primario, a dosis clínicamente relevantes. Pero como se indica en el apartado de introducción de esta tesis, estos efectos no deseados podrían limitarse solo a condiciones asociadas con alteraciones moderadas o severas de la integridad de la barrera hematoencefálica (Reynolds et al., 1997), como en el caso de las enfermedades neurodegenerativas tipo Parkinson o Alzheimer y en el cerebro en periodo de maduración.

Es en este contexto específico donde nuestros hallazgos deben representar una advertencia, en particular cuando se requieren dosis relativamente elevadas de esta γ -ciclodextrina para la rápida reversión de los BNMND.

El fármaco SUG se distribuye en los líquidos extracelulares del organismo, siendo su volumen de distribución en adultos de aproximadamente 11-14 litros (Bridion. (EMA, 2008; Yang & Keam, 2009). Una simple dosis de administración de SUG 16, 20, o 32 mg/kg en combinación con ROC 1.2 mg/kg o VEC 0.1 mg/kg es bien tolerada en los voluntarios sanos y además sin ninguna evidencia clínica de la presencia residual de BNM. De esta manera, podemos concluir que las combinaciones anteriormente mencionadas pueden ser administradas de manera segura y simultánea (Cammu et al., 2008).

Debido a que SUG forma complejos 1:1 con las drogas esteroideas BNMND, muchas de las moléculas de SUG administradas permanecen libres en el medio extracelular. Además, en determinados pacientes que presentan alteraciones de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, SUG podría estar presente en el parénquima cerebral pudiendo llegar a ser tóxico. En nuestro estudio la presencia de SUG ocasionó una disminución de la viabilidad neuronal de manera dependiente tanto de la concentración como del tiempo transcurrido.

En este sentido, estudios farmacocinéticos llevados a cabo en voluntarios sanos muestran que después de la administración simultánea de SUG (16 mg/kg) y ROC (1.2 mg/kg) o VEC (0.1 mg/kg), la concentración plasmática de la γ -ciclodextrina libre fue de 70-80 mg/ml (Cammu, G. et al., 2008), no alcanzando niveles de toxicidad.

Nuestros resultados muestran que el SUG causa muerte celular, predominantemente por apoptosis (87,7%) y en menor medida por necrosis (12,3%) en cultivos primarios de neuronas y que la inducción de la apoptosis se asocia con una alteración en la homeostasis neuronal del colesterol. Esta molécula es un componente abundante de la membrana plasmática de las células eucariotas y es un regulador esencial de la fluidez de la membrana, de la permeabilidad de la misma,

de la movilidad de los receptores de membrana y de la actividad de los canales iónicos (Brown & London, 1998).

En células cancerígenas A431 se ha demostrado que la disminución del colesterol usando metil- β -ciclodextrina, filipina III, colesterol oxidasa o mevastatina, conduce a la formación espontánea de agrupaciones de los complejos Fas-FADD, activación de la caspasa-8 y en última instancia a la apoptosis (Li et al., 2006). De hecho, se ha demostrado que la muerte neuronal por inhibición del tráfico intracelular del colesterol es dependiente de las caspasas y está asociada a la activación de la vía de la apoptosis mitocondrial (Huang et al. 2006).

Por lo tanto el mantenimiento de la homeostasis del colesterol, tanto del presente en la membrana celular como del de ubicación intracelular, es fundamental para permitir la proliferación y la supervivencia celular en condiciones fisiológicas y patológicas (Martin et al., 2010).

La distribución del colesterol en las membranas no es uniforme y su contenido es particularmente alto en las áreas submicroscópicas también ricas en gangliosidos y esfingolípidos. Estos micro-dominios conocidos como los "lipid-rafts" o balsas de lípidos, actúan como plataformas moleculares que organizan espacialmente las moléculas de los diferentes receptores presentes en la membrana (Simons & Toomre, 2001). Las β -ciclodextrinas y las carboximetil- β -ciclodextrinas inducen la muerte celular apoptótica dependiente de caspasas en queratinocitos humanos que presentan disminución de colesterol en las membranas, mientras que las α -ciclodextrinas, γ -ciclodextrinas y 2-hidroxipropil- β -ciclodextrinas no producen apoptosis en este tipo de células (Schönfelder et al., 2006).

Por otra parte, determinados autores han publicado que la disminución del colesterol por metil- β -ciclodextrinas bloquea el transporte de la toxina del cólera desde los endosomas al aparato de Golgi en las neuronas del hipocampo (Shogomori & Futerman, 2001), y que el enriquecimiento de la membrana plasmática de las neuronas con colesterol protege a las neuronas corticales de la apoptosis inducida por oligómeros solubles del péptido tóxico A β ₁₋₄₀ (Sponne et al., 2004).

En esta tesis se demuestra por primera vez que la γ -ciclodextrina puede causar daño a las neuronas y que este efecto está asociado a la disminución del colesterol en las membranas plasmáticas celulares y en las estructuras correspondientes a las membranas de organelas intracelulares.

Por todo lo expuesto sería adecuado para la prevención del daño neuronal recomendar el tratamiento previo con colesterol.

Diferentes estudios sugieren que el colesterol sería beneficioso para la integridad de las células parenquimatosas cerebrales (Paul et al., 2017). De manera consistente, otros autores han demostrado que el mantenimiento de los niveles fisiológicos de colesterol en las células, parece disminuir la muerte neuronal (asociado a especies reactivas de oxígeno) causada por priones peptídicos a través de la regulación de los niveles proteicos de p53, P-p38 y P-ERK (Reynolds et al., 1997; Jeong et al., 2010).

Se sabe que el estrés oxidativo juega un papel importante en las enfermedades neurodegenerativas, y determinados resultados demuestran que el colesterol elevado en las células podría protegerlas frente al estrés oxidativo en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer (Huang et al., 2013). La adaptación de las células neuronales al estrés oxidativo crónico está asociada a la acumulación de colesterol, a la homeostasis alterada de los esfingolípidos y a la función lisosomal (Cardone et al., 1994).

La liberación de Cit c mitocondrial asociada al estrés celular es, en su mayor parte, independiente de las caspasas. Además, la liberación de Smac/Diablo es un evento catalizado por las caspasas, siendo su síntesis un proceso que ocurre después de la liberación del Cit c. Además, existen diferentes evidencias que demuestran que la apoptosis asociada a la liberación de Citc y de Smac/Diablo desde la mitocondria, es mediada por mecanismos diferentes en cada caso. Smac/Diablo es exportado desde la mitocondria al citosol celular y se puede inducir por la acción de diferentes drogas citotóxicas, así como por la presencia de ADN dañado, e igualmente por la unión del receptor de muerte CD95 (Huang et al., 2006).

Nuestros resultados evidencian una expresión proteica incrementada de Smac/Diablo después de la adición de SUG si lo comparamos con las muestras control. También resulta destacable la presencia de muerte celular causada por inhibición del movimiento intracelular del colesterol dependiente de las caspasas y asociado con la activación de la vía apoptótica mitocondrial.

Se detectó una disminución en la expresión de las proteínas Smac/Diablo y Citc después de la adición de SUG+Colesterol comparado con las muestras en las que estaba únicamente presente el SUG. Este hallazgo experimental demostraría una disminución de la apoptosis tras la adición de colesterol. En otros estudios se ha indicado un aumento de Smac/Diablo por la vía apoptótica, probablemente producido por inhibición del desarrollo de las células B de la médula ósea y de la diferenciación de las células T, así como por la disminución de células esplénicas T, tal como ha sido publicado por Huang y sus colaboradores (Huang et al., 2006).

Sin embargo, la acumulación de colesterol podría tener efectos diferentes a los anteriores, ya que ciertos autores sugieren que la presencia de excesivo colesterol en las mitocondrias puede ser el paso clave en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (Fuchs-Buder et al., 2004). En referencia a lo indicado anteriormente, U18666A, un agente inhibidor del transporte de colesterol, produce una acumulación excesiva de colesterol intracelular en neuronas en cultivo primario, provocando activación de las caspasas, de las calpainas, aumentando también la hiperfosforilación de la proteína tau y la apoptosis celular (Tassonyi et al., 2002).

La asociación potencial de las alteraciones inducidas por SUG en la homeostasis del colesterol, con la activación de los procesos de estrés oxidativo y los conducentes a la apoptosis y muerte celular por necrosis, junto con el hecho de que la resistencia o la sensibilidad al estrés oxidativo puede diferir entre regiones cerebrales y tipos de células neuronales, añadiendo además las interacciones potenciales entre neuronas y astrocitos, así como la modulación del proceso por mecanismos patológicos como la inflamación, representan todos una ventana nueva de investigación que merecería futuros estudios e investigaciones.

Los fármacos bloqueantes neuromusculares, tales como ROC y VEC, se usan ampliamente en la práctica médica habitual con objeto de provocar la relajación de los músculos esqueléticos, facilitar la ventilación mecánica y prevenir los movimientos anómalos durante la intervención quirúrgica para posibilitar la intubación endotraqueal en las técnicas anestésicas (Claudius et al., 2009; Kovac, 2009).

El SUG es el fármaco más ampliamente utilizado para la reversión del efecto relajante tanto de ROC como de VEC. Las cadenas laterales de SUG se unen a los bloqueantes neuromusculares de forma no covalente (Akha et al., 2010; Bom et al., 2009) y además las interacciones de Van-der-Waals también intervienen pero con un papel menor. Es de destacar que los grupos cargados positivamente de NMNB se unen electrostáticamente a los grupos terminales cargados negativamente de SUG (Akha et al., 2010).

Las moléculas de ROC-SUG son incapaces de unirse al receptor de la acetilcolina (Adam et al., 2002). SUG forma un complejo 1:1 con las drogas BNMND, rápidamente se produce la encapsulación de los BNMND por parte del SUG, reduciéndose de esta forma la concentración de ROC y VEC en la unión neuromuscular y en el plasma. Debido a ello, se produce la reversión del bloqueo neuromuscular (Yang & Keam, 2009). Sin embargo, muchas de las moléculas administradas permanecen libres en el medio extracelular del organismo.

En pacientes sanos, se realiza la administración simultánea de SUG junto con ROC que presenta concentraciones plasmáticas que disminuyen más rápidamente que las de SUG (Cammu et al., 2008). De esta manera la presencia de SUG libre en plasma es facilitada, lo que podría conducir a diferentes efectos deletéreos del SUG, bien en células parenquimatosas periféricas como en el sistema nervioso central.

Otros relajantes musculares como son VEC y pancuronium también se pueden unir con SUG pero con mucha menor afinidad a como lo hace ROC (Bom et al., 2009; Akha et al., 2010). La afinidad de SUG por ROC es 2,5 veces mayor que para VEC y además es similar a la que presentan las moléculas endógenas por sus receptores (Bom et al., 2009).

La molécula de ROC es absorbida por el hígado y presenta una excreción biliar, urinaria y fecal (Proost et al., 2000). Por tanto los efectos de ROC se prolongan cuando disminuye la eliminación renal o hepática, produciéndose una mayor vida media plasmática de ROC, como ocurre en pacientes con fallo renal (Cammu et al., 2012; de Souza et al., 2015). SUG es eliminado rápidamente por la vía renal (Peeters et al., 2011).

Es interesante añadir que la eliminación renal de ROC aumenta con la presencia de SUG. Además, la unión de ROC-SUG es eliminada principalmente por vía renal (Ren & Jahr, 2009).

Uno de los principales efectos secundarios del SUG es la inducción de hipersensibilidad, presentando diferentes síntomas tales como: eritema (Soria et al., 2012), hipotensión, taquicardia (Jeyadoss et al., 2014) y edema generalizado (Sadleir et al., 2014). Por otra parte, SUG provoca náuseas, dolores de cabeza, incluso dolores generalizados y/o vómitos (Lemmens et al., 2010; Ren & Jahr, 2009). Después de la extubación traqueal se produce la presencia de bloqueantes neuromusculares residuales que pueden ocasionar complicaciones pulmonares, parálisis muscular, obstrucción aérea y aumento de la morbilidad (Jones et al., 2008; Lemmens et al., 2010).

La alergia a ROC o VEC es la primera causa de reacciones anafilácticas postoperatorias (Chiriac & Demoly, 2016). ROC produce, en algunos casos, complicaciones cardiovasculares después de la inducción con anestésicos (Schulberg et al., 2016). Los pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a antibióticos poseen mayores reacciones alérgicas dermatológicas y representan un grupo de mayor riesgo para desarrollar reacciones anafilácticas que la población en general (Hagau et al., 2016). Además, ROC presenta interacciones potentes con otros fármacos incluidos los antibióticos aminoglucósidos (Hasfurther & Bailey, 1996).

Otros BNMND como VEC producen anafilaxia e inhiben también el receptor de acetilcolina ocasionando la diferenciación de las células stem de glioblastoma derivándolos a astrocitos (Spina et al., 2016). Sin embargo, ROC produce una reacción anafiláctica mayor comparada con VEC (Sadleir et al., 2013).

El SUG ha sido usado para revertir la reacción anafiláctica producida por ROC. Sin embargo, no ha sido posible identificar el mecanismo exacto de reversión, aunque la hipótesis más plausible es que sea debido al mecanismo de encapsulación previamente citado (Barbosa & Cunha, 2012). Además, SUG es capaz de reducir el número de mastocitos tras la reacción anafiláctica (Tomak et al., 2012).

También existen dudas de que la excreción de ROC pudiera detener el proceso anafiláctico ya que la cascada alérgica y la activación de los mastocitos y su degranulación ya se han desencadenado. De hecho, SUG no puede parar la reacción alérgica en estudios sanguíneos con ROC (Leysen et al., 2011). Cabe destacar que la presencia de SUG en el organismo produce un aumento en el tiempo de tromboplastina y protrombina, pero no ha sido asociado con un aumento del riesgo de hemorragia comparándolo con una situación fisiológica (Rahe-Meyer et al., 2014).

Como previamente hemos indicado para el SUG, tampoco el ROC o VEC atraviesan la barrera hematoencefálica en individuos sanos (Reynolds et al., 1997; Huang et al., 2013). Sin embargo, existen claras evidencias de que pacientes con daño tanto funcional como orgánico en la barrera hematoencefálica y tratados con estos fármacos, presentaron disfunción autonómica, crisis epilépticas e incluso muerte neuronal (Cardone et al., 1994).

Por otra parte, ROC, pero no VEC, ha sido detectado en el líquido cefalorraquídeo en pacientes con hemorragia subaracnoidea que fueron sometidos a diferentes intervenciones neuroquirúrgicas (Cardone et al., 2004; Tassonyi et al., 2002). Estos hallazgos pueden ser atribuidos al hecho de que el ROC es una molécula con mayor hidrosolubilidad que el VEC, de forma que alcanzaría más rápidamente el parénquima cerebral cuando la barrera hematoencefálica se encuentra dañada (Roy & Varin, 2004).

Estos estudios indican que en las condiciones clínicas en las que esté comprometida la integridad de la barrera hematoencefálica, como ocurre en diferentes enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, en el daño traumático cerebral, en la isquemia o hemorragia cerebral, en la meningitis o en el sistema nervioso inmaduro, se podría presentar neurotoxicidad

inducida por estos fármacos (Langley et al., 2016; Schmidt et al., 2000; Rahe-Meyer et al., 2014).

No existen datos clínicos o artículos publicados con el uso de SUG en mujeres gestantes o lactantes. Estudios en animales demuestran la no existencia de efectos negativos directos o indirectos sobre el feto, o durante el desarrollo postnatal (Bridion EMEA 2008). En la población pediátrica y en mujeres gestantes se pueden presentar riesgos añadidos con el uso de ROC, VEC o SUG (Langley et al., 2016).

De hecho, SUG no es recomendado por un grupo importante de especialistas, para pacientes menores de dos años ya que no existen datos disponibles, en esta población, acerca del riesgo de toxicidad neuronal de estos fármacos, dato que debería tenerse en cuenta para futuras investigaciones (Langley et al., 2016). No existen criterios bien establecidos debido a que algunos especialistas sí que recomiendan el uso de estos fármacos (Bridion. EMEA 2008). Se desconoce si SUG está presente en la leche materna, pero en estudios con animales se demuestra un cierto grado de excreción. Sin embargo, la absorción intestinal por vía oral de SUG es baja y por lo tanto no se cree que pueda afectar a los lactantes.

El proceso de envejecimiento supone una disminución de la funcionalidad de la mayor parte de los aparatos y sistemas orgánicos, así como de los procesos de degradación metabólica de múltiples fármacos (Priebe, 2000). En este sentido, diferentes autores señalan que en la población anciana la eliminación de ROC, VEC o SUG no es dependiente de la edad (McDonagh et al., 2011). De todas maneras, la recuperación tras la anestesia es más prolongada en la población mayor, pero este efecto parece ser secundario porque existen diferentes cambios en el organismo y en las funciones fisiológicas durante el proceso de envejecimiento (Leysen et al., 2011; Shin et al., 2015).

Otros autores sugieren que en la electromiografía practicada a ancianos, se detectan fallos que responden a problemas con el retorno a valores basales, probablemente debidos a la edad y especialmente en el caso de ROC (De Almeida et al., 1996). Cabe señalar que en este estudio hemos usado las dosis recomendadas de SUG, ROC y VEC para obtener uniones adecuadas de los

BNMND con SUG y una reversión moderada o profunda de BNMND (ROC o VEC) similar a la recomendada en la cirugía clínica (Gijzenbergh et al., 2005; Jones et al., 2008).

Por todo lo expuesto, se debería en todo momento considerar un uso adecuado de ROC, VEC y SUG para conseguir un equilibrio entre la concentración plasmática de los fármacos, evitando su posible toxicidad. En nuestro estudio, como ha quedado patente, SUG puede tener efectos nocivos neuronales que se evitan cuando se une a ROC o VEC. Hay que tener en cuenta que la presencia de SUG libre podría atravesar la barrera hematoencefálica en casos como en ancianos, enfermedades neurodegenerativas, traumatismos, enfermedades inflamatorias y en la población gestante e infantil. Por lo tanto, resulta fundamental ajustar las dosis de estos fármacos con el objetivo de impedir el SUG libre. Nuestro estudio se ha realizado con experimentos “in vitro” por lo que sería necesario e interesante realizar estudios “in vivo” para determinar los efectos de estos fármacos.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El SUG produce muerte de neuronas en cultivo primario de ratas, tanto por necrosis como por apoptosis.
2. La activación de la apoptosis producida por el SUG se puede relacionar con la homeostasis del colesterol y además con disminución del mismo en las membranas plasmáticas celulares y en las estructuras correspondientes a las membranas de organelas intracelulares.
3. La presencia de SUG produce un aumento de la expresión proteica de AIF, de Citocromo c y de Smac/Diablo junto con un aumento de la actividad de la caspasa 3, si lo comparamos con neuronas control. En conjunto, estos datos nos indican que el SUG induce procesos apoptóticos en neuronas en cultivo primario.
4. La presencia de colesterol junto con SUG produce una disminución significativa de la expresión proteica de AIF, Citocromo c y Smac/Diablo, así como una disminución en la actividad de la Caspasa 3, con lo que el colesterol supone un factor protector ante la apoptosis inducida por el SUG.
5. Ni ROC ni VEC, producen cambios en la viabilidad neuronal y ambos fármacos unidos por separado a SUG inhibieron los efectos nocivos de este sobre las neuronas.
6. La presencia de ROC o VEC unido a SUG impide la sobreexpresión de AIF, Citocromo c y Smac/Diablo ocasionado por SUG, así como el aumento en la actividad de la caspasa 3 y de la liberación de LDH. Estos datos nos indican un efecto protector de ROC y VEC frente a la muerte celular inducida por SUG.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41-53.
- Abrishami, A., Ho, J., Wong, J., Yin, L., & Chung, F. (2009). Sugamadex, a selective reversal medication for preventing postoperative residual neuromuscular blockade. *The Cochrane Library*.
- Adam, J. M., Bennett, D. J., Bom, A., Clark, J. K., Feilden, H., Hutchinson, E. J., & Stevenson, D. (2002). Cyclodextrin-Derived Host Molecules as Reversal Agents for the Neuromuscular Blocker Rocuronium Bromide: Synthesis and Structure–Activity Relationships. *Journal of medicinal chemistry*, 45(9), 1806-1816.
- Adams, J. M., & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381), 1322-1326.
- Akha, A. S., Rosa, J., Jahr, J. S., Li, A., & Kiai, K. (2010). Sugamadex: cyclodextrins, development of selective binding agents, pharmacology, clinical development, and future directions. *Anesthesiology clinics*, 28(4), 691-708.
- Amorós, J., Solera, J., & Gonzalez, F. (2000). Interacciones. *Relajantes musculares en anestesia y terapia intensiva*. Álvarez JA, Bustamante R y Gonzalez F, eds. Editorial Libro del Año. Madrid, 165.
- Angosto, M. C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 69, No. 1).
- Anom:Rocuronium:Micromedex.Inc.,Denver,Colorado
http://www.sefh.es/revistas/vol19/n3/175_177.PDF
- Antonsson, B., & Martinou, J. C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Experimental cell research*, 256(1), 50-57.
- Ariño-Irujo, J. J., Calbet-Mañueco, A., De la Calle-Elguezabal, P. A., Velasco-Barrio, J. M., López-Timoneda, F., Ortiz-Gómez, J. R.,... & Pérez-Cajaraville, J. (2010). Monitorización del bloqueo neuromuscular. 1ª parte. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 57(3), 153-160.
- Azizi, S. A., & Krynska, B. (2013). Derivation of neuronal cells from fetal normal human astrocytes (NHA). *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, 89-96.
- Bai, L., Smith, D. C., & Wang, S. (2014). Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 144(1), 82-95.

- Baldo, B. A., McDonnell, N. J., & Pham, N. H. (2011). Drug-specific cyclodextrins with emphasis on sugamadex, the neuromuscular blocker rocuronium and perioperative anaphylaxis: implications for drug allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 41(12), 1663-1678.
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*, 16(1), 1-13.
- Barbosa, F. T., & Cunha, R. M. D. (2012). Reversal of profound neuromuscular blockade with sugamadex after failure of rapid sequence endotracheal intubation: a case report. *Revista brasileira de anestesiologia*, 62(2), 283-284.
- Barnum, S.R. (2002). Complement in central nervous system inflammation. *Immunologic research*, 26(1-3), 7-13.
- Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S. R., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., & Raff, M. C. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, 70(1), 31-46.
- Becerra, L. V., & Pimienta, H. J. (2009). Apoptosis neuronal: la diversidad de señales y de tipos celulares. *Colombia Médica*, 40(1), 124-133.
- Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2009). Neurovascular mechanisms and blood–brain barrier disorder in Alzheimer’s disease. *Acta neuropathologica*, 118(1), 103-113.
- Bom, A., Bradley, M., Cameron, K., Clark, J. K., van Egmond, J., Feilden, H., .. & Zhang, M. Q. (2002). A novel concept of reversing neuromuscular block: chemical encapsulation of rocuronium bromide by a cyclodextrin-based synthetic host. *Angewandte Chemie*, 114(2), 275-280
- Bom, A., Hope, F., Rutherford, S., & Thomson, K. (2009). Preclinical pharmacology of sugammadex. *Journal of critical care*, 24(1), 29-35.
- Bowman, W. C. (1980). Prejunctional and Postjunctional Cholinoceptors at the Neuromuscular Junction. *Anesthesia & Analgesia*, 59(12), 935-943
- Bowman, W. C. (1998). Recent discoveries in neuromuscular transmission. *Recent advances in anaesthesia and analgesia*, 20, 21-42
- Bowman W. C. Neuromuscular block. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1, S277-S286 (2006)
- Bridion. (EMA) 2008; European Medicines Agency. European Public Assessment Report for Bridion (sugamadex): scientific discussion [online]. Available from

http://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2010/2010020974878/annex_74878_es.pdf

- Bustamante Bozzo, R., Alvarez Gomez, J. A., González Miranda, F., & Bustamante Bozzo, R. (2000). Recuperación Espontánea y Revisión Farmacológica de los Relajantes Musculares. *Alvarez Gomez JA, González Miranda F, Bustamante Bozzo R-Relajantes Musculares*. Madrid, Arám, 129-137.
- Bustamante Bozzo, R. (2004). Bloqueadores neuromusculares en cuidados intensivos. *Rev. chil. anest*, 33(2), 147-174.
- Bustamante Bozzo, R. (2007). Bloqueadores neuromusculares no despolarizantes. *Hospital de Urgencia Asistencial Pública PDF] Bloqueadores Neuromusculares No Despolarizantes (24/9/2007)*.
- Bradford, H. F. (1988). Células Gliales: Células de soporte mecánico y funcional del sistema nervioso. *BRADFORD, HF: Fundamentos de Neuroquímica, Barcelona, Labor*.
- Brown, D. A., & London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology*, 14(1), 111-136.
- Cajal, S. R. (1913). Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano.
- Cammu, G., De Kam, P. J., Demeyer, I., Decoopman, M., Peeters, P. A. M., Smeets, J. M. W., & Foubert, L. (2008). Safety and tolerability of single intravenous doses of sugammadex administered simultaneously with rocuronium or vecuronium in healthy volunteers. *British journal of anaesthesia*, 100(3), 373-379.
- Cammu, G., Van Vlem, B., Van Den Heuvel, M., Stet, L., el Galta, R., Eloot, S., & Demeyer, I. (2012). Dialysability of sugammadex and its complex with rocuronium in intensive care patients with severe renal impairment. *British journal of anaesthesia*, 109(3), 382-390.
- Cardinali, D. P. (1999). Los componentes del sistema nervioso. *HUMANA*, 35.
- Cardone, C., Szenohradzky, J., Yost, S., & Bickler, P. E. (1994). Activation of brain acetylcholine receptors by neuromuscular blocking drugs. A possible mechanism of neurotoxicity. *Anesthesiology*, 80(5), 1155-61.
- Casanova ER. Apoptosis. www.egoncasanova.cl. mayo 2003
- Chamorro, C., Romera, M. A., Pardo, C., & Silva, J. A. (2001). Nuevos bloqueadores neuromusculares. *Medicina intensiva*, 25(9), 340-343.

- Chamorro, C., Silva, J., & de la Semicyuc, G. D. (2008). Monitorización del bloqueo neuromuscular. *Medicina Intensiva*, 32(Supl. 1), 53-58.
- Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(2), 137-149.
- Chiriac, A. M., Demoly, P. (2016) Allergy to neuromuscular blocking agents. *Presse Med.* 45: 768-773.
- Claudius, C., Garvey, L. H., & Viby-Mogensen, J. (2009). The undesirable effects of neuromuscular blocking drugs. *Anaesthesia*, 64(s1), 10-21.
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *The Lancet*, 372(9648), 1502-1517.
- Cordero Escobar, I., Rey Martínez, B., & Pérez Carbonell, A. (2011). Reversión del rocuronio con sugamadex en pacientes con procedimientos de larga duración. Presentación de casos. *Revista Cubana de Anestesiología y Reanimación*, 10 (2), 152-157.
- Darias, A., Migdel, G., Cordero Escobar, I., & Pérez Martínez, G. (2014). Reversión del bloqueo neuromuscular inducido por vecuronio: sugamadex o neostigmina. *Revista Cubana de Anestesiología y Reanimación*, 13(3), 253-267.
- Das, G. D., & Altman, J. (1970). Postnatal neurogenesis in the caudate nucleus and nucleus accumbens septi in the rat. *Brain research*, 21(1), 122-127.
- Davoust, N., Vuillat, C., Androdias, G., & Nataf, S. (2008). From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends in immunology*, 29(5), 227-234.
- De Almeida, M. C., Latorre, F., Gervais, H. W., & Kleeman, P. P. (1996). The effects of age on onset and recovery from atracurium, rocuronium and vecuronium blockade. *Der Anaesthetist*, 45(10), 903-906.
- de la Torre-Anderson, J., de la Torre-Buendía, J., & Zamora-García, V. (2014). Eficacia y seguridad del sugamadex. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 37(2), 77-82.
- de Souza, C. M., Tardelli, M. A., Tedesco, H., Garcia, N. N., Caparros, M. P., Alvarez-Gomez, J. A., & de Oliveira, I. S. (2015). Efficacy and safety of sugammadex in the reversal of deep neuromuscular blockade induced by rocuronium in patients with end-stage renal disease: A comparative prospective clinical trial. *European Journal of Anaesthesiology (EJA)*, 32(10), 681-686.

- del Moral, R. G. (1993). Laboratorio de anatomía patológica. McGraw-Hill Interamericana de España.
- del Río-Hortega, P. (1928). *Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía*.
- C Dodla, M., Mumaw, J., & L Stice, S. (2010). Role of astrocytes, soluble factors, cells adhesion molecules and neurotrophins in functional synapse formation: implications for human embryonic stem cell derived neurons. *Current stem cell research & therapy*, 5(3), 251-260.
- Eddleston, M., & Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54(1), 15-36.
- Eguiluz, N. L., DynaKin, S.L. 54 Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. 24 de septiembre de 2009
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), 1313-1317.
- Farrar JT. Meeting of the Anesthetic and Life Support Drugs FDA Advisory Committee, Silver Spring, MD Sugamadex 2008. NDA 222-225.
- FDA. 2008. Food and Drug Administration. Anesthetic and Life Support Advisory Committee Meeting: briefing document (background package) for sugamadex sodium injection [online]. Available from URL: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/08/briefing/2008-4346b1-02-Organon.pdf>.
- Fernández, A. M., & Torres Alemán, I. (2012). Astrocitos y Alzheimer. *Mente y Cerebro*, 56
- Fernandez, P. A., Tang, D. G., Cheng, L., Prochiantz, A., Mudge, A. W., & Raff, M. C. (2000). Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron*, 28 (1), 81-90.
- Flores Soto, M. E., & JE, S. T. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci*, 6(4), 315-326.
- Fu, A., Zhou, Q. H., Hui, E. K. W., Lu, J. Z., Boado, R. J., & Pardridge, W. M. (2010). Intravenous treatment of experimental Parkinson's disease in the mouse with an IgG-GDNF fusion protein that penetrates the blood–brain barrier. *Brain research*, 1352, 208-213.

- Fuchs-Buder, T., Strowitzki, M., Rentsch, K., Schreiber, J. U., Philipp-Osterman, S., & Kleinschmidt, S. (2004). Concentration of rocuronium in cerebrospinal fluid of patients undergoing cerebral aneurysm clipping. *British journal of anaesthesia*, 92(3), 419-421.
- Gard, A. L., Burrell, M. R., Pfeiffer, S. E., Rudge, J. S., & Williams, W. C. (1995). Astroglial control of oligodendrocyte survival mediated by PDGF and leukemia inhibitory factor-like protein. *Development*, 121(7), 2187-2197.
- Gasque, P., Dean, Y. D., McGreal, E. P., VanBeek, J., & Morgan, B. P. (2000). Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology*, 49(1), 171-186.
- Gaszynski, T., Szewczyk, T., & Gaszynski, W. (2011). Randomized comparison of sugamadex and neostigmine for reversal of rocuronium-induced muscle relaxation in morbidly obese undergoing general anaesthesia. *British journal of anaesthesia*, aer330.
- Giaume, C., Maravall, M., Welker, E., & Bonvento, G. (2009). The barrel cortex as a model to study dynamic neuroglial interaction. *The Neuroscientist*, 15(4), 351-366
- Gijzenbergh, F., Ramael, S., Houwing, N., & van Iersel, T. (2005). First human exposure of Org 25969, a novel agent to reverse the action of rocuronium bromide. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 103(4), 695-703.
- Gniadecki, R. (2004). Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 320(1), 165-169.
- Gómez, J. Á., Irujo, J. A., Oyonarte, C. E., Torrente, F. M., i Solé, J. R., & Rodríguez, F. G. (2009). Empleo clínico de bloqueantes neuromusculares y su reversión. Recomendaciones del grupo de expertos de la Sociedad Española de Anestesiología, Reanimación y Tratamiento del Dolor. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 56(10), 616-627.
- Gomez, J. A. A., Miranda, F. G., Bozzo, R. B., Relajantes Musculares. *Madrid, Arán*, 107-120.

- Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1992). Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *The journal of neuroscience*, 12(9), 3642-3650.
- Granados Tinajero, S. O., (2011) Clínica de Relajantes Musculares 2. *Clínicas Mexicanas de Anestesiología*, número 16, enero–abril de 2012 chapter 4
- Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 13(15), 1899-1911.
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astroцитos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*, 30(2), 119-129.
- Haines, D. E. (2014). Principios de neurociencia (No. 611.8). Elsevier,
- Hagau, N., Gherman, N., Cocis, M., & Petrisor, C. (2016). Antibiotic-induced immediate type hypersensitivity is a risk factor for positive allergy skin tests for neuromuscular blocking agents. *Allergology International*, 65(1), 52-55.
- Hangen, E., Blomgren, K., Bénit, P., Kroemer, G., & Modjtahedi, N. (2010). Life with or without AIF. *Trends in biochemical sciences*, 35(5), 278-287.
- Hasfurther, D. L., & Bailey, P. L. (1996). Failure of neuromuscular blockade reversal after rocuronium in a patient who received oral neomycin. *Canadian journal of anaesthesia*, 43(6), 617-620.
- Heider, J. G., & Boyett, R. L. (1978). The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture. *Journal of lipid research*, 19(4), 514-518.
- Hermoza, D. M. P. Trabajo de Investigación de segunda Especialización en Medicina Humana para optar al Título de Especialista en Anestesiología.
- Hernández-Muela, S., Mulas, F., & Mattos, L. (2004). Plasticidad neuronal funcional. *Rev Neurol*, 38(1), 58-68.
- Hoyos, M. L., & García, E. M. (2004). Apoptosis: implicaciones en medicina intensiva. *Medicina intensiva*, 28(6), 319-328.
- Huang, S., Kim, J. K., Atochin, D. N., Farrar, C. T., Huang, P. L., Suh, J. Y., .. & Kim, Y. R. (2013). Cerebral blood volume affects blood–brain barrier integrity in an acute transient stroke model. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(6), 898-905.
- Huang, Z., Hou, Q., Cheung, N. S., & Li, Q. T. (2006). Neuronal cell death caused by inhibition of intracellular cholesterol trafficking is caspase dependent and

- associated with activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *Journal of neurochemistry*, 97(1), 280-291.
- Jeong J. K, Seol J. W, Moon M. H, Seo J. S, Lee Y. J, Kim J. S, Park S. Y (2010). Cellular cholesterol enrichment prevents prion peptide-induced neuron cell damages. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 29; 401(4):516-20.
 - Jérez-Escobar, J., & Martínez-Visbal, A. (2015). Rol de los receptores nicotínicos de acetilcolina en mecanismos de dolor. *Revista Ciencias Biomédicas*, 6(1).
 - Jeyadoss, J., Kuruppu, P., Nanjappa, N., & Van Wijk, R. M. (2014). Sugammadex hypersensitivity-a case of anaphylaxis. *Anaesthesia and intensive care*, 42(1), 89.
 - Jones, R. K., Caldwell, J. E., Brull, S. J., & Soto, R. G. (2008). Reversal of Profound Rocuronium-induced Blockade with Sugammadex A Randomized Comparison with Neostigmine. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 109(5), 816-824.
 - Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Offarm*, 22(6), 100-106.
 - Karalapillai, D., Kaufman, M., & Weinberg, L. (2013). Sugammadex.
 - Katz, R. L. (1967). Neuromuscular effects of d-tubocurarine, edrophonium and neostigmine in man. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 28(2), 327-336.
 - Kaur, C., & Ling, E. A. (2008). Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Current neurovascular research*, 5(1), 71-81.
 - Kettenmann, H., & Ransom, B. R. 2013, September). The Concept of Neuroglia. In Oxford University Press.)
 - Khuenl-Brady, K. S., Wattwil, M., Vanacker, B. F., Lora-Tamayo, J. I., Rietbergen, H., & Alvarez-Gómez, J. A. (2010). Sugammadex provides faster reversal of vecuronium-induced neuromuscular blockade compared with neostigmine: a multicenter, randomized, controlled trial. *Anesthesia & Analgesia*, 110(1), 64-73.
 - King, M. W., Yopez, T. M., & Reyes, T. S. (2011). Bioquímica médica.
 - Kovac, A. L. (2009). Sugammadex: the first selective binding reversal agent for neuromuscular block. *Journal of clinical anesthesia*, 21(6), 444-453.
 - Langley, R. J., McFadzean, J., & McCormack, J. (2016). The presumed central nervous system effects of rocuronium in a neonate and its reversal with sugammadex. *Pediatric Anesthesia*, 26(1), 109-111.

- Laza-Knoerr, A. L., Gref, R., & Couvreur, P. (2010). Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of drug targeting*, 18(9), 645-656.
- Lemmens, H. J., El-Orbany, M. I., Berry, J., & Martin, G. (2007). Sugamadex reverses profound vecuronium blockade more rapidly than neostigmine. *Anesthesiology*, 107, A1578.
- Lemmens, H. J., El-Orbany, M. I., Berry, J., Morte, J. B., & Martin, G. (2010). Reversal of profound vecuronium-induced neuromuscular block under sevoflurane anesthesia: sugammadex versus neostigmine. *BMC anesthesiology*, 10(1), 15.
- Leysen, J., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., & Ebo, D. G. (2011). Rocuronium-induced anaphylaxis is probably not mitigated by sugammadex: evidence from an in vitro experiment. *Anaesthesia*, 66(6), 526-527.
- Levey, A. I. (1996). Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13541-13546.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489.
- Li, Y. C., Park, M. J., Ye, S. K., Kim, C. W., & Kim, Y. N. (2006). Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *The American journal of pathology*, 168(4), 1107-1118.
- López, J. F., Arana, C. A. C., & Monzón, C. G. C. (2012). La monitorización neuromuscular y su importancia en el uso de los bloqueantes neuromusculares. *Revista Colombiana de Anestesiología*, 40(4), 293-303.
- López, S. B., & Andresen, M. Bloqueo De La Transmisión Neuromuscular.
- Lorigados-Pedre, L., & Bergado-Rosado, J. (2004). El factor de crecimiento nervioso en la neurodegeneración y el tratamiento neurorestaurador. *Rev Neurol*, 10, 957-971.

- Losy, J. (2013). Is MS an inflammatory or primary degenerative disease?. *Journal of Neural Transmission*, 120(10), 1459-1462.
- Luján, R. (2004). Bases moleculares de la señalización neuronal. *Ciencia al día Internacional (periódico na internet)*, 19.
- Luque López E, Blasco Guerrero B, Horta Hernández. Sugamadex. Informe para la Comisión de Farmacia y Terapéutica del Hospital Universitario de Guadalajara 2009. En línea. [Consultada: 5/5/16]. URL disponible en www.gruposdetrabajo.sefh.es/genesis//Documents/Sugamadex_HUG_0709.pdf
- M^a Antuña Braña, Santiago Herrero, José A La puerta bloqueantes neuromusculares. En línea. [Consultada: 5/5/16]. URL disponible en http://www.uninet.edu/cimc2000/conferencia/conf3/BLOQ_NEURO.htm
- Martin, M., Dotti, C. G., & Ledesma, M. D. (2010). Brain cholesterol in normal and pathological aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(8), 934-944.
- Martínez, E., (2009). Informe Técnico De Evaluación De Sugamadex Comisión Farmacia Y Terapéutica.
- Matute, C., Torre, I., Pérez-Cerdá, F., Pérez-Samartín, A., Alberdi, E., Etxebarria, E., & Domercq, M. (2007). P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Neuroscience*, 27(35), 9525-9533.
- McDonagh, D. L., Benedict, P. E., Kovac, A. L., Drover, D. R., Brister, N. W., Morte, J. B., & Monk, T. G. (2011). Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of Sugammadex for the Reversal of Rocuronium-induced Meeting Abstracts in Elderly Patients. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 114(2), 318-329.
- McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D.,... & Sandberg-Wollheim, M. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 50(1), 121-127.
- Meistelman C, Debaene B et Donati F. Farmacologie des curares. Enc. Med Chir (Elservier, Paris), Anesthesie-Reanimation, 36-355-10, 1998,24p Vecuronio universidad autonoma de madrid en la web
- Mendoza Patiño, N. A. (2008). *Farmacología médica* (No. Sirsi) i9789687988443).

- Merino Pérez, J., Noriega Borge, M.J. (2010) Fisiología general. En línea [Consultada: el 16/12/16] URL disponible en <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/bloque-ii/Tema%2010-Bloque%20II-Fisiologia%20del%20Musculo.pdf>
- Mirakhur, R. K. (1992). Newer Neuromuseular Blocking Drugs. *Drugs*, 44(2), 182-199.
- Mook-Kanamori, B. B., Geldhoff, M., van der Poll, T., & van de Beek, D. (2011). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clinical microbiology reviews*, 24(3), 557-591.
- Murphy, G. (2016). The development and regulatory history of sugamadex in the United States. *guide for authors*, 53.
- Nácher Carda, V. (1995). La microglía y su función inmunitaria en el sistema nervioso.
- Nag, K., Singh, D. R., Shetti, A. N., Kumar, H., Sivashanmugam, T., & Parthasarathy, S. (2013). Sugamadex: A revolutionary drug in neuromuscular pharmacology. *Anesthesia, Essays and Researches*, 7(3), 302.
- Naguib, M. (2007). Sugamadex: another milestone in clinical neuromuscular pharmacology. *Anesthesia & Analgesia*, 104(3), 575-581.
- Ndubaku, U., & de Bellard, M. E. (2008). Glial cells: old cells with new twists. *Acta histochemica*, 110(3), 182-195.
- Neostigmina Anes Net En línea. [Consultada: 5/5/16]. URL disponible en www.uam.es/departamentos/medicina/anesnet/agenda/farmacologia/neostigmina.htm
- Nguyen, K. C., Rosales, J. L., Barboza, M., & Lee, K. Y. (2002). Controversies over p25 in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 4(2), 123-126.
- Ortega-Camarillo, C., Díaz-Flores, M., Avalos-Rodríguez, A., Vergara-Onofre, M., & Rosales-Torres, A. M. (2001). La apoptosis y su importancia biomédica. *Gac Méd Méx*, 137(6), 563-77.
- Ortiz-Gómez, J. R., & Pérez-Cajaraville, J. (2006). Reversión del bloqueo neuromuscular residual por atracurio y vecuronio con dosis bajas de neostigmina Reversion of atracurium and vecuronium residual nondepolarising neuromuscular blockade with low doses of neostigmine. *An. Sist. Sanit. Navar*, 29 (2), 189-198.

- Oswaldo, A., 2012 <http://es.slideshare.net/OswaldoAngeles/agonistas-y-antagonistas-colinrgicos>
- Palanca, J. M., Aguirre-Rueda, D., Granell, M. V., Aldasoro, M., Garcia, A., Iradi, A., & Valles, S. L. (2013). Sugamadex, a neuromuscular blockade reversal agent, causes neuronal apoptosis in primary cultures. *Int J Med Sci*, 10 (10), 1278-85.
- Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V., Oliet, S. H., Schousboe, A., Haydon, P. G., ... & Pekny, M. (2012). Glial cells in (patho) physiology. *Journal of neurochemistry*, 121(1), 4-27.
- Parreño Caparrós, M. (2015). Efecto de sugamadex sobre el intervalo QT/QTc en la reversión profunda del bloqueo neuromuscular inducido por rocuronio en pacientes con y sin insuficiencia renal.
- Pascual-Castroviejo, I. (1996). Plasticidad cerebral. *Revista de neurología*, 24(135), 1361-1366.
- Paton, F., Paulden, M., Chambers, D., Heirs, M., Duffy, S., Hunter, J. M. ... & Woolacott, N. (2010). Sugamadex compared with neostigmine/glycopyrrolate for routine reversal of neuromuscular block: a systematic review and economic evaluation. *British journal of anaesthesia*, 105 (5), 558-567.
- Peeters, P., Passier, P., Smeets, J., Zwiers, A., De Zwart, M., van de Wetering-Krebbbers, S. ... & Van den Dobbelsteen, D. (2011). Sugammadex is cleared rapidly and primarily unchanged via renal excretion. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 32(3), 159-167.
- Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, 317(5841), 1083-1086.
- Paul, R., Choudhury, A., Kumar, S., Giri, A., Sandhir, R., Borah, A. (2017). Cholesterol contributes to dopamine-neuronal loss in MPTP mouse model of Parkinson's disease: Involvement of mitochondrial dysfunctions and oxidative stress. *PLoS One*. Feb 7; 12(2):e0171285. DOI: 10.1371/journal.pone.0171285
- Priebe, H. J. (2000). The aged cardiovascular risk patient. *British journal of anaesthesia*, 85(5), 763-778.
- Proost, J. H., Eriksson, L. I., Mirakhor, R. K., Roest, G., & Wierda, J. M. K. H. (2000). Urinary, biliary and faecal excretion of rocuronium in humans. *British journal of anaesthesia*, 85(5), 717-723.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., & Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family

- member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular cell*, 3(3), 287-296.
- Rahe-Meyer, N., Fennema, H., Schulman, S., Klimscha, W., Przemec, M., Blobner, M. ... & Woo, T. (2014). Effect of reversal of neuromuscular blockade with sugammadex versus usual care on bleeding risk in a randomized study of surgical patients. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 121(5), 969-977.
 - Ramírez-Rodríguez, G., Benítez-King, G., & Kempermann, G. (2007). Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: neurogénesis. *Salud mental*, 30(3), 12-19.
 - Ramón y Cajal, 1913 Ramón y Cajal, S. R. (1913). Estudios sobre la degeneración del sistema nervioso.
 - Rebolledo, F. A. (2003). Plasticidad cerebral. Parte 1. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 41(1), 55-64
 - Ren, W. H., & Jahr, J. S. (2009). Reversal of neuromuscular block with a selective relaxant-binding agent: sugammadex. *American journal of therapeutics*, 16(4), 295-299.
 - Reynolds, L. M., Lau, M., Luks, A., Sharma, M., & Fisher, D. M. (1997). Bioavailability of intramuscular rocuronium in infants and children. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 87(5), 1096-1105.
 - Ripoll Coronado, L. I. (2014). Análisis de los resultados obtenidos durante la práctica clínica habitual en la reversión del bloqueo neuromuscular superficial con sugammadex: valoración de su impacto farmacoeconómico.
 - Roy, J. J., & Varin, F. (2004). Physicochemical properties of neuromuscular blocking agents and their impact on the pharmacokinetic–pharmacodynamic relationship. *British journal of anaesthesia*, 93(2), 241-248.
 - Sabroso, C. M., & Suárez, A. I. T. (2013, July). Nuevas estrategias en terapia antitumoral basadas en la inducción de la apoptosis. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 79, No. 2).
 - Sadleir, P. H. M., Clarke, R. C., Bunning, D. L., & Platt, P. R. (2013). Anaphylaxis to neuromuscular blocking drugs: incidence and cross-reactivity in Western Australia from 2002 to 2011. *British journal of anaesthesia*, 110(6), 981-987.

- Sadleir, P. H. M., Russell, T., Clarke, R. C., Maycock, E., & Platt, P. R. (2014). Intraoperative anaphylaxis to sugammadex and a protocol for intradermal skin testing. *Anaesthesia and intensive care*, 42(1), 93.
- Sanai, N., Tramontin, A. D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S. ... & Berger, M. S. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427(6976), 740-744.
- Saunders, N. R., Knott, G. W., & Dziegielewska, K. M. (2000). Barriers in the immature brain. *Cellular and molecular neurobiology*, 20(1), 29-40.
- Schaller, S. J., & Fink, H. (2013). Sugamadex as a reversal agent for neuromuscular block: an evidence-based review. *Core Evid*, 8(8), 57-67.)
- Schmidt, S., Saunders, A. M., De La Paz, M. A., Postel, E. A., Heinis, R. M., Agarwal, A., ... & Gass, J. D. (2000). Association of the apolipoprotein E gene with age-related macular degeneration: possible effect modification by family history, age, and gender. *Mol Vis*, 6(287), 93.
- Schönfelder, U., Radestock, A., Elsner, P., & Hipler, U. C. (2006). Cyclodextrin-induced apoptosis in human keratinocytes is caspase-8 dependent and accompanied by mitochondrial cytochrome c release. *Experimental dermatology*, 15(11), 883-890.
- Schulberg, E. M., Webb, A. R., & Kolawole, H. (2016). Early skin and challenge testing after rocuronium anaphylaxis. *Anaesthesia & Intensive Care*, 44(3).
- Shin, S., Han, D. W., Lee, H. S., Song, M. K., Jun, E. K., & Kim, S. Y. (2015). Elderly patients require higher doses of sugammadex for rapid recovery from deep neuromuscular block. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*.
- Shogomori, H., & Futerman, A. H. (2001). Cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin blocks cholera toxin transport from endosomes to the Golgi apparatus in hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry*, 78(5), 991-999.
- Shlosberg, D., Benifla, M., Kaufer, D., & Friedman, A. (2010). Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*, 6(7), 393-403.
- Simons, K., & Toomre, D. (2001). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 2(3), 216-216.
- Snell, R. S. (2007). Neuroanatomía clínica. Ed. Médica Panamericana.

- Song, H., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417(6884), 39-44.
- Soria, A., Motamed, C., Gaouar, H., Chemam, S., Amsler, E., & Francès, C. (2012). Severe reaction following sugammadex injection: hypersensitivity? *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 22(5), 382.
- Spina, R., Voss, D. M., Asnaghi, L., Sloan, A., Bar, E. E. (2016). Atracurium Besylate and other neuromuscular blocking agents promote astroglial differentiation and deplete glioblastoma stem cells. *Oncotarget*. Jan 5; 7(1):459-72
- Sponne, I., Fifre, A., Kriem, B., Koziel, V., Bihain, U., Oster, T., Olivier, J. L., & Pillot, T. (2004). Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide. *FASEB journal: official publication of the Federation* Isabelle Sponne,*
- Squire, L., Berg, D., Bloom, F. E., Du Lac, S., Ghosh, A., & Spitzer, N. C. (Eds.). (2012). *Fundamental neuroscience*. Academic Press.
- Sterin-Speziale, N., & Leocata Nieto, F. (2007). Los esfingolípidos en la muerte y proliferación celular. *Revista Química Viva*, 3, 234-50.
- Stolp, H. B., & Dziegielewska, K. M. (2009). Review: role of developmental inflammation and blood–brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathology and applied neurobiology*, 35(2), 132-146.
- Tassonyi, E., Fathi, M., Hughes, G. J., Chiodini, F., Bertrand, D., Muller, D., & Fuchs-Buder, T. (2002). Cerebrospinal fluid concentrations of atracurium, laudanosine and vecuronium following clinical subarachnoid hemorrhage. *Acta anaesthesiologica scandinavica*, 46(10), 1236-1241.
- Tomak, Y., Yilmaz, A., Bostan, H., Tümkaya, L., Altuner, D., Kalkan, Y., & Erdivanlı, B. (2012). Effects of sugammadex and rocuronium mast cell number and degranulation in rat liver. *Anaesthesia*, 67(10), 1101-1104.
- Torres, L. E. S., & Vargas, F. D. (2012). Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 41(1).
- Valles SL, Borrás C, Gambini J, et al. Vallés, S. L., Borrás, C., Gambini, J., Furriol, J., Ortega, A., Sastre, J.,... & Viña, J. (2008). Oestradiol or genistein rescues neurons from amyloid-beta-induced cell death by inhibiting activation of p38. *Aging cell*, 7(1), 112-118.

- Valles, S. L., Dolz-Gaiton, P., Gambini, J., Borrás, C., Lloret, A., Pallardo, F. V., & Viña, J. (2010). Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR γ expression in cultured astrocytes. *Brain research*, 1312, 138-144.
- Vega Pedrero, M. J. (2016). Conexión Neuronal: El potencial de acción. [Consultada: el 15/11/16] URL disponible en <http://www.hablemosdeneurociencia.com/conexion-neuronal-potencial-accion/>
- Veiga-Ruiz, G., Domínguez, N., Orozco, J., Janda, M., Hofmockel, R., & Alvarez-Gómez, J. A. (2008). [Efficacy of sugamadex in the reversal of neuromuscular blockade induced by rocuronium in long-duration surgery: under inhaled vs. intravenous anesthesia]. *Revista española de anestesiología y reanimación*, 56(6), 349-354.
- Vílchez, D., de Córdoba, S. R., & Guinovart, J. J. (2009). Enfermedad de Lafora: epilepsia y regulación del metabolismo de glucógeno por laforina y malina. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Virchow, R. (1858). Reizung und Reizbarkeit. *Virchows Archiv*, 14(1), 1-63.
- Vucic, D., Deshayes, K., Ackerly, H., Pisabarro, M. T., Kadkhodayan, S., Fairbrother, W. J., & Dixit, V. M. (2002). SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 12275-12279.
- Waubant, E. (2006). Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Disease markers*, 22(4), 235-244.
- Waud, B. E., & Waud, D. R. (1972). The margin of safety of neuromuscular transmission in the muscle of the diaphragm. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 37(4), 417-422.
- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., & Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology*, 139(5), 1281-1292.
- Wyss-Coray, T., & Mucke, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron*, 35(3), 419-432.
- Yonfa, A. Relajantes Musculares en Anestesia Pediátrica. Volumen 18 Suplemento 1 2006
- Yang, L. P., & Keam, S. J. (2009). Sugammadex. *Drugs*, 69(7), 919-942.

- Yoshida, H. (2003). The role of Apaf-1 in programmed cell death: from worm to tumor. *Cell structure and function*, 28(1), 3-9.)

9. ANEXOS

ANEXO I



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00220

Vista la solicitud realizada en fecha 21/11/16 con nº reg. entrada 29748 por D/D^a. Pilar Campins Falcó, Vicerrectora de Investigación i Política Científica, centro usuario ES462500001003, para realizar el procedimiento:

"Mecanismos de acción de diferentes fármacos en células neurales en cultivo primario (sugamadex, rocuronio, ranolazina) y otras sustancias (cannabis, alcohol, colas, etc.)"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2016/VSC/PEA/00220 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Uiversitat de Valencia

Responsable del proyecto: Lilian Soraya Vallés Martí

Establecimiento: Animalario Facultad de Medicina y Odontología de Valencia

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 14 de diciembre de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Rogelio Llanes Ribas

