



PRÁCTICAS DE FARMACOLOGÍA Y FARMACOTERAPIA I

Curso 2020-2021

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

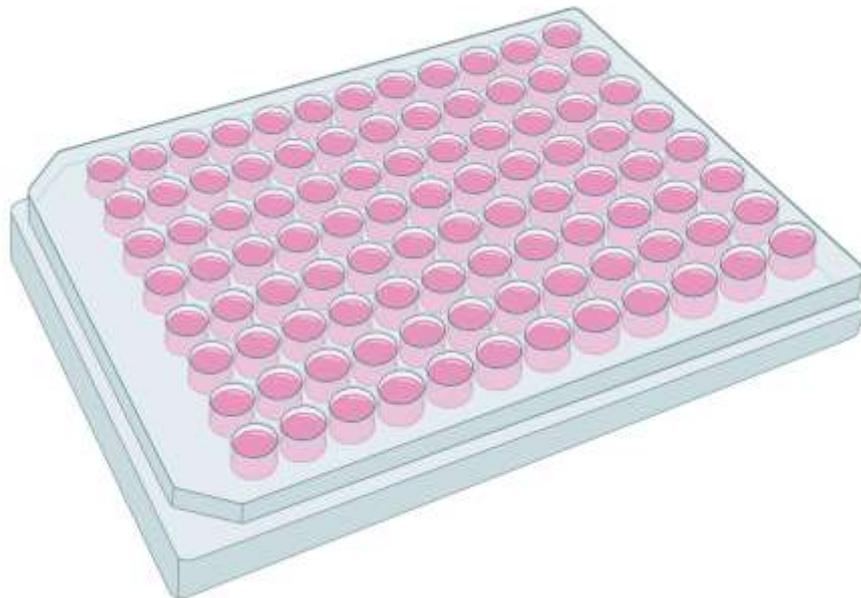
INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de la farmacología es obtener un conocimiento profundo de las acciones y propiedades de los fármacos en el organismo. Con este conocimiento se pretende una aplicación racional, segura y responsable de los medicamentos. Por ello, durante el estudio de una nueva sustancia con posible potencial terapéutico es necesario la realización de diferentes estudios y ensayos para obtener la mayor información posible para su posterior extrapolación a los pacientes. Es aquí donde entra en juego la farmacología experimental, la cual estudia las propiedades y acciones de una sustancia en estudio mediante modelos experimentales. Los distintos tipos de ensayos y experimentos que se pueden realizar se pueden clasificar de forma simple en tres categorías:

- Ensayo *in vitro*: no implica el uso de organismos vivos, es decir, se realiza dentro de un tubo de ensayo o en cualquier otro ambiente artificial. A menudo supone el uso de tejido/órgano aislado o células mantenidos en un ambiente artificial durante más de 24 horas.
- Ensayo *ex vivo*: se realiza sobre o en tejidos biológicos vivos o células que han sido aislados de un organismo vivo y son mantenidos en el laboratorio en un ambiente artificial durante un periodo corto de tiempo, alterando lo más mínimo las condiciones naturales.
- Ensayo *in vivo*: se realiza sobre organismos vivos. Cuando este tipo de ensayos implica el uso de humanos, se habla de ensayos clínicos.

Durante estas prácticas, los alumnos aprenderéis los principios y fundamentos básicos de estos ensayos mediante la realización experimental de un ensayo *in vitro* y la realización virtual de un ensayo *in vivo*.

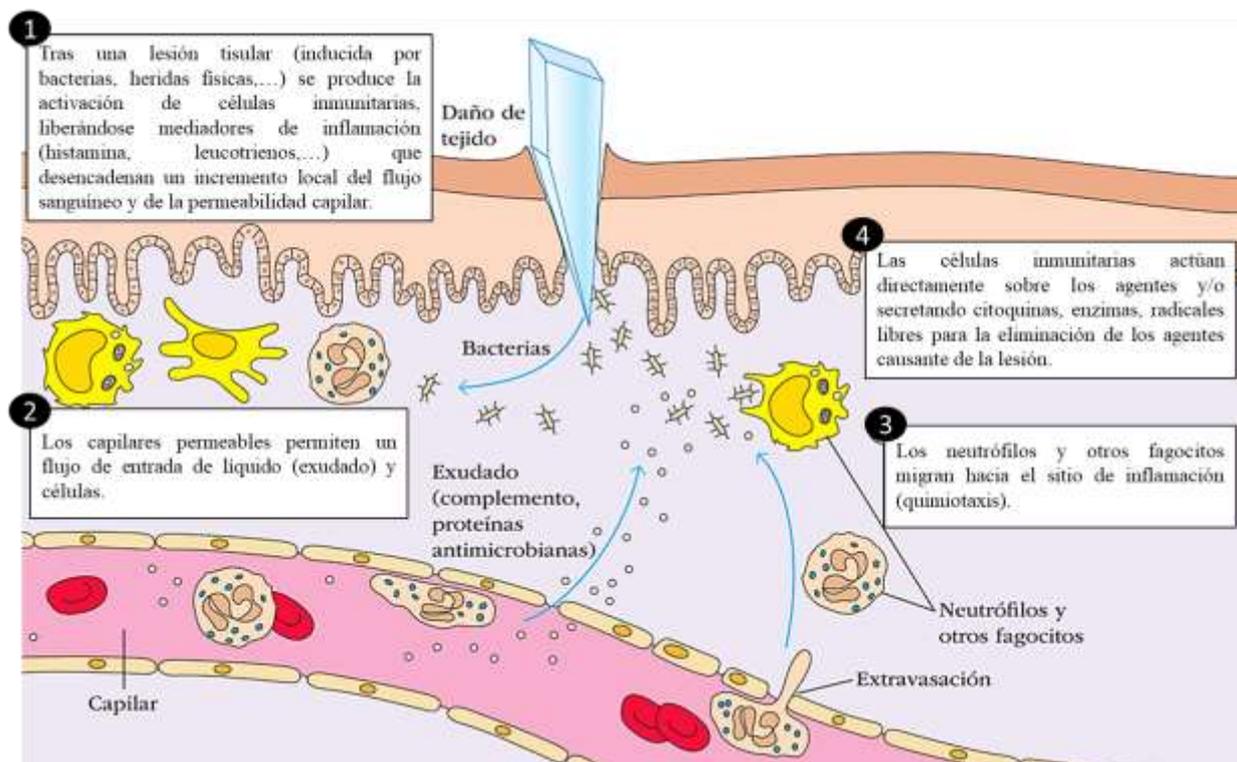
1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA *IN VITRO* DE UNA MOLÉCULA EN DESARROLLO PRECLÍNICO



1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA *IN VITRO* DE UNA NUEVA MOLÉCULA EN ESTUDIO.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta fisiológica protectora de tejidos que han sido afectados por lesiones inducidas por traumatismos físicos, sustancias nocivas o microorganismos. Durante la respuesta inflamatoria, se desencadena una serie de eventos que incluye una dilatación de los vasos sanguíneos locales, causando síntomas típicos de la inflamación como enrojecimiento, calor e hinchazón en la zona afectada. Con esta vasodilatación se pretende que se amplíe la respuesta inflamatoria, permitiendo el acceso a la zona afectada de células inmunitarias como neutrófilos, macrófagos, linfocitos, y otros factores implicados en la inflamación (Figura 1). En esta respuesta tan compleja intervienen numerosos mediadores como la histamina, la sustancia P, citoquinas, prostaglandinas, entre otros. El objetivo principal es la inactivación/destrucción de los agentes



causantes de la lesión, así como el inicio de la cascada de señales para la reparación del tejido afectado (1).

Figura 1. Ejemplo de respuesta inflamatoria frente a una infección. Figura modificada de Owen J.A. INMUNOLOGIA DE KUBY 7ª edición. 2010.

Sin embargo, cuando la respuesta inflamatoria causa dolor y/u otros síntomas que impiden la realización de tareas/acciones básicas de la vida diaria, o se trata de una respuesta crónica que desencadene enfermedades como la artritis reumatoide, es necesario el tratamiento con fármacos como los Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs).

Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs)

Los AINEs son un grupo de fármacos ampliamente utilizados en clínica con interesantes propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas (2) (ver Tema 18, temario de Farmacología y Farmacoterapia I). Actúan inhibiendo la actividad de las ciclooxigenasas (COX), enzimas que intervienen en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico (Figura 2). Algunas de estas prostaglandinas están involucradas en la inflamación, el dolor y la fiebre, por tanto, la inhibición de sus síntesis por los AINEs es la causa de las acciones terapéuticas de éstos. Sin embargo, otras prostaglandinas están involucradas en procesos fisiológicos y la inhibición de sus síntesis por los AINEs provoca las reacciones adversas características de este grupo de fármacos, como el daño a nivel de la mucosa gástrica.

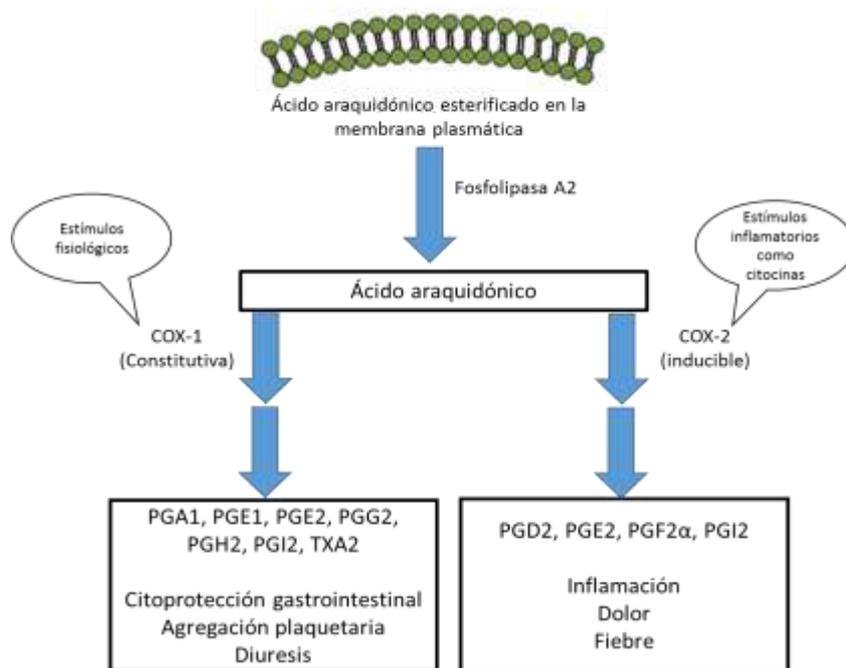


Figura 2. Ruta del ácido araquidónico a través de las ciclooxigenasas. Tras la liberación del ácido araquidónico de la membrana celular, dependiendo del estímulo implicado y el tejido, actuará la COX-1 o la COX-2. La acción de COX-1 desencadena la síntesis de prostanoides involucrados en las

funciones fisiológicas como la presión arterial, la agregación plaquetaria, etc. La acción de COX-2 genera prostanoïdes involucrados en procesos como inflamación, dolor y fiebre.

En la búsqueda de fármacos antiinflamatorios con mejor perfil de toxicidad que los AINEs surgieron los Coxibs que son inhibidores más específicos de la COX-2, la isoforma implicada en la inflamación. Sin embargo, este grupo de fármacos no está exento de reacciones adversas. La industria farmacéutica continúa la búsqueda de fármacos antiinflamatorios con mejor perfil terapéutico, buscando fármacos con mayor actividad farmacológica y menor toxicidad. En esta búsqueda, las nuevas moléculas objeto de evaluación de su posible potencial antiinflamatorio deben someterse a una batería de ensayos para confirmar su actividad y seguridad antes de poderse emplear en pacientes. En la primera fase de estudio, la fase preclínica, se utilizarán distintos modelos *in vitro* e *in vivo* para probar la actividad y toxicidad de estas nuevas moléculas. Dentro de los primeros ensayos que se realizarán, los cultivos celulares ocupan un lugar muy importante en la farmacología experimental.

Durante estas prácticas, los alumnos evaluarán la posible actividad antiinflamatoria de una molécula en estudio en comparación con el AINE Indometacina en una línea celular humana.

Cultivos celulares

Desde que en 1952 Grey y colaboradores lograron mantener la primera línea celular continua, HeLa (células de cáncer de cérvix originarias de la paciente Henrietta Lacks), los cultivos celulares se han convertido en una herramienta vital en la investigación y en la tecnología farmacéutica. Como cultivo celular se entiende el mantenimiento de células de forma artificial fuera del organismo original, manteniendo lo más parecido posible las propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas de las células originales (13). Los cultivos celulares se incluyen entre la metodología *In Vitro* y son útiles en numerosos campos de investigación y tecnología, como, por ejemplo:

- Investigación básica de toxicidad: permiten conocer el grado de toxicidad de una sustancia antes de realizar ensayos en animales.
- Investigaciones farmacocinéticas, por ejemplo, el uso de células hepáticas para estudiar posibles rutas metabólicas de la sustancia en estudio.
- Ingeniería de proteínas: la producción de proteínas, como la insulina, en líneas celulares.
- Investigación preclínica en cáncer: el uso de cultivos celulares es el primer paso para evaluar la actividad anticancerosa de nuevos fármacos.

Para mantener las células en cultivo es necesario tener en cuenta las siguientes condiciones/parámetros:

- Soporte/recipiente de cultivo. Las células se mantienen dentro de recipientes generalmente de plástico que han sido esterilizados por irradiación. Los recipientes más utilizados son las placas de Petri y los frascos de Roux (recipientes en forma de botella que pueden tener un filtro para la ventilación/aireación del cultivo) (Figura 3). Existen dos grandes tipos de células, aquellas que necesitan crecer adheridas a un soporte (células adherentes) y aquellas que crecen en suspensión, es decir, en el propio medio de cultivo (células en suspensión). La mayoría de líneas celulares disponibles comercialmente son células adherentes, por lo que es necesario utilizar frascos de Roux cuya superficie ha sido tratada con colágeno, fibronectina, gelatina, poli-D-lisina, etc. Este tratamiento facilita la adhesión celular, permitiendo el crecimiento de las células. Por otra parte, las células en suspensión suelen ser la mayoría de origen hematopoyético y no requieren de recipientes con superficies tratadas, pero algunas líneas celulares requieren de agitación continua para facilitar su suspensión y crecimiento.

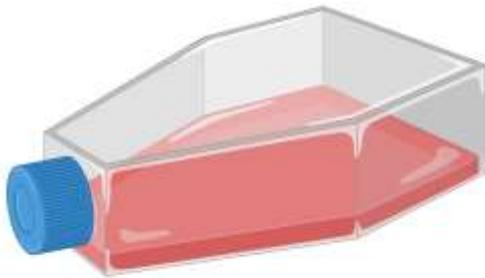


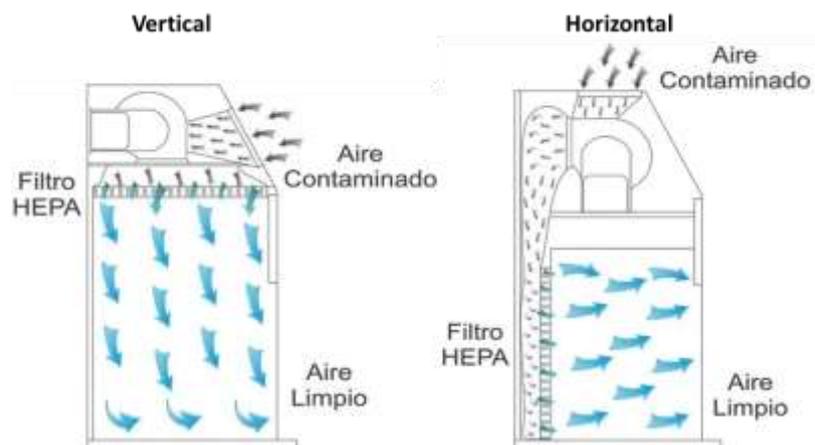
Figura 3. Imagen de un frasco de Roux para cultivo celular.

- El medio de cultivo. Es el parámetro más importante a la hora de mantener un cultivo celular. Existen numerosos tipos de medios comerciales cuya composición varía según las necesidades de las células. El medio de cultivo no solamente aporta los nutrientes necesarios para que la célula viva, sino que también contribuye a mantener el pH y la osmolaridad óptimos para las células. La composición básica de un medio de cultivo incluye:
 - o Mezcla de sales inorgánicas para mantener la osmolaridad y aportar los iones más básicos como sodio y potasio. Esta mezcla suele contener bicarbonato sódico que será necesario para mantener un pH óptimo para las células, el cual suele estar en torno a 7,4.
 - o Mezcla de aminoácidos esenciales. Los medios de cultivos deben contener todos los aminoácidos esenciales que las células no pueden sintetizar por sí mismas. Según el tipo celular, esta mezcla debe completarse con aminoácidos no esenciales para facilitar la proliferación celular. La glutamina es el aminoácido no esencial que suele ser requerido por casi todos los cultivos celulares. La glutamina es una fuente energética importante para numerosas líneas celulares y, además, es precursora de glutatión, una de las defensas antioxidantes más importantes a nivel celular.
 - o Mezcla de vitaminas. Aunque la mayoría de las vitaminas del medio provienen del suero (componente que se añade para completar los medios), algunos medios contienen vitaminas, especialmente del grupo B.

- Glucosa. Es la fuente energética y precursora de otros componentes celulares que es fundamental para las células en cultivo. Junto con glucosa, algunos medios también contienen piruvato como una fuente extra.
- El medio de cultivo antes de su uso debe completarse con los siguientes componentes:
 - Suero, generalmente de origen fetal bovino. Es necesario completar el medio con 5-20% de Suero, ya que éste aporta una serie de componentes vitales para el crecimiento celular en cultivo:
 - Vitaminas.
 - Factores de crecimientos y hormonas como hidrocortisona.
 - Ácidos grasos.
 - Oligoelementos y otros micronutrientes.
 - Factores de adhesión, como la fibronectina, necesarios para células adherentes.
 - Inhibidores de proteasas que son necesarios para células adherentes, puesto que éstos inhibirán a la tripsina, enzima utilizada en el mantenimiento de este tipo de células.
 - Otros: transferrina como portadora de Fe, poliaminas, ...
 - Antibióticos y antifúngicos para evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo celular. Generalmente se suele utilizar una mezcla de penicilina y estreptomina.
 - Rojo fenol u otros indicadores de pH. No son necesarios para el crecimiento celular pero sí que ayudan al mantenimiento. Por ejemplo, el rojo fenol tiene un color rojizo cuando el pH es óptimo para las células (7,4), pero si el medio está muy consumido, el color virará a amarillo (pH inferior a 6,5), indicando que es necesario el cambiar el medio. Esto se debe a que, durante el metabolismo, las células producen ácidos que acidifican el medio y si el pH disminuye, será perjudicial para las células. Un pH amarillo también puede indicar una contaminación microbiana. Por el contrario, si el pH se vuelve básico, el rojo fenol pasa a un color púrpura. Un pH básico también es perjudicial para las células y podría indicar un problema en la regulación de los gases del incubador.
- Condiciones de incubación: para mantener los cultivos celulares es necesario un instrumento conocido como incubador. Este aparato permite mantener a las células en condiciones óptimas de:
 - Temperatura. De forma general, la temperatura que se mantiene en el incubador es 37°C, que es la óptima de crecimiento para muchos tipos de células de origen mamífero.

- pH de forma indirecta al mantener una atmósfera de 5% CO₂. El oxígeno de la atmósfera (21%) es suficiente para el crecimiento celular, pero es necesario que el incubador inyecte CO₂ para mantener el pH. El CO₂ es necesario para el equilibrio de la solución tamponadora del medio (normalmente bicarbonato). Existen medios de cultivos especiales que no necesitan regular los niveles de CO₂ para mantener el pH.
- Humedad. El incubador suele contener una cubeta que contendrá agua estéril con un antifúngico para mantener la humedad dentro del incubador.
- Ambiente estéril. Todos los componentes que entren en contacto con las células deben haber sido esterilizados previamente para evitar contaminaciones por microorganismos. Por otra parte, la manipulación de los cultivos celulares suele realizarse en el interior de cabinas de flujo laminar que mantienen la esterilidad del aire. El aire en el interior de la cabina es introducido a través de un filtro HEPA, el cual retiene todas las partículas superiores a las 0,2 micras que podrían contaminar los cultivos. Cuando el flujo de aire limpio entra por la parte superior de la cabina, se habla de flujo vertical, mientras que cuando entra por la pared frontal, se habla de flujo horizontal (Figura 4).

Figura 4. Ejemplos de cabinas de flujo laminar.



Los cultivos celulares presentan numerosas ventajas (13), entre las que destacan:

- Control preciso del ambiente celular tanto de factores físico-químicos (temperatura, presión osmótica, pH,...) como fisiológicas (nutrientes, hormonas, ...). Al utilizarse medios de cultivos de composición definida e incubadores especiales de cultivo, se controlan muchos parámetros que no serían posibles en otros modelos. A pesar de ello, existen condiciones que no se pueden controlar, como el suero utilizado para aportar los factores de crecimiento cuya composición puede variar según el lote utilizado.
- Si se trata de una línea celular definida, las muestras son bastante homogéneas al provenir todas del mismo tipo celular. Se evita la heterogeneidad que es común en otros modelos, como en el caso del uso de animales.

- Economía y espacio. Los cultivos celulares son relativamente baratos y requieren de bastante menos espacio para su trabajo que otras líneas de investigación, como el uso de animales.
- Éticas. La utilización de cultivos celulares proporciona mucha información que permite reducir el uso y número de animales en las fases posteriores de la investigación de un nuevo fármaco.

Sin embargo, los cultivos celulares también presentan desventajas:

- Necesidad de trabajar en condiciones de esterilidad. Al tener que utilizarse medios de cultivos ricos en nutrientes, los cultivos celulares son muy sensibles a la contaminación por bacterias, hongos y otros organismos. Por ello, es necesario trabajar en condiciones asépticas, utilizar material e instrumentación especial, así como el entrenar al personal que trabaje con ellos.
- Inestabilidad genética. La mayoría de las células con capacidad para la proliferación continua *in vitro* son cancerosas o se han modificado genéticamente, con lo que presentan una gran inestabilidad genética, pudiéndose formar diferentes subpoblaciones celulares. Si el cultivo se mantiene de forma continua durante un largo periodo, se corre el riesgo de variación en la composición celular si alguna de las subpoblaciones celulares presenta una mayor velocidad proliferativa que las otras. La solución es “reiniciar” el cultivo celular a partir de muestras congeladas.
- Difícil extrapolación a organismos completos. A pesar de la ventaja de conocer las condiciones en las que se mantienen las células, presentan la desventaja de que es totalmente artificial. Son células que ya no se encuentran en su ambiente natural, por lo que:
 - o Se ha perdido la conectividad e interacción con otras células de diferente tipo.
 - o Se ha perdido la orientación/organización tridimensional propia del tejido/órgano original.
 - o Se pierde la regulación inducida por los sistemas nervioso y endocrino.
 - o Las condiciones/parámetros en las que se mantienen las células no son siempre comparables a las que tendrían en el organismo. Por ejemplo, las células en cultivo están expuestas al oxígeno del ambiente (21%) que es bastante superior al que estarían expuestas en el interior del organismo original (2-10%, dependiendo del tejido), por lo que normalmente las células mantenidas *in vitro* presentan mayores niveles de estrés oxidativo.

Por ello, los datos obtenidos en ensayos *in vitro* deben utilizarse de forma razonable para la extrapolación en estudios *in vivo*.

Dentro de los cultivos celulares mencionados anteriormente, en estas prácticas los alumnos aprenderán a manejar células en suspensión, concretamente la línea celular humana HL60.

Utilización de cultivos celulares para la evaluación de la actividad antiinflamatoria de moléculas en estudio

Los monocitos, macrófagos y neutrófilos son células del sistema inmune que cooperan durante el inicio, la progresión y la resolución de la inflamación (3). Ante determinados estímulos proinflamatorios, metabólicos e inmunes se desencadena un aumento en el reclutamiento de estas células desde los vasos sanguíneos al tejido afectado, contribuyendo a la defensa del huésped, la remodelación y reparación del tejido (4,5). Estas células intervienen en la respuesta inflamatoria de diferentes formas, incluyendo la secreción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-8 e IL-6, entre otros (5). En la respuesta inflamatoria inducida por estas células también intervienen otros factores y proteínas como el factor de transcripción nuclear (NF) -KB, la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la mieloperoxidasa (MPO) y la COX-2 (5).

En las últimas décadas, el desarrollo de fármacos antiinflamatorios está dirigido hacia el bloqueo del TNF- α , de las enzimas proinflamatorias COX-2 e iNOS, y de las vías del NF-KB y de las MAP cinasas (6). Entre los primeros ensayos que se realizan para estudiar un nuevo fármaco antiinflamatorio, destaca el uso de los cultivos celulares, concretamente el uso de leucocitos debido a su papel fundamental en la respuesta inflamatoria. Existen numerosas líneas celulares comerciales de este tipo que son de gran utilidad porque permiten conocer cómo cambia la expresión y actividad de diferentes factores relacionados con la inflamación tras la exposición al fármaco en estudio.

Esta práctica tiene como objetivo la evaluación de la actividad antiinflamatoria de un compuesto en desarrollo farmacológico, en comparación con la indometacina, en la línea celular HL60 (leucemia promielocítica aguda). Estas células son promielocitos, es decir, que son precursoras de los granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos) y, por tanto, presentan muchas de las propiedades de estas células, como la expresión de numerosos factores implicados en la inflamación tales como COX-2, MPO y NF-KB (7). Concretamente se evaluará la capacidad la molécula en estudio y de indometacina para inhibir a la enzima MPO. Por otra parte, la manipulación *in vitro* de las células HL60 permite diferenciarlas en otros tipos celulares mieloides, como los macrófagos, por lo que también se utilizará esta línea celular para medir la actividad antiinflamatoria de los compuestos sobre la producción del óxido nítrico (NO).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA MIELOPEROXIDASA (MPO).

La MPO es una enzima expresada constitutivamente en los fagosomas de los neutrófilos y monocitos (8). En procesos inflamatorios, estas células migran al área inflamada y se transforman en células secretoras, liberando radicales libres de oxígeno y enzimas, como la MPO, con el objetivo de eliminar al agente patógeno causante de la inflamación. Los neutrófilos producen anión superóxido que es reducido a peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual es utilizado por la enzima MPO para oxidar cloruro (Cl⁻) en ácido hipocloroso (HOCl). El HOCl es un oxidante muy potente con actividad antimicrobiana, participando en el proceso de eliminación de patógenos. Sin embargo, este oxidante también es

causante del daño tisular característico de la inflamación crónica. El HOCl reacciona con numerosas moléculas, produciendo degradación e inactivación de enzimas y otras proteínas, oxidando lípidos de membrana celulares, y otros procesos que acaban generando daño tisular, agravando la inflamación. Los AINEs son potentes fármacos antiinflamatorios cuyo principal mecanismo de acción se debe a su capacidad para inhibir a las ciclooxigenasas. Sin embargo, también se sabe que existen otros mecanismos implicados en su actividad antiinflamatoria, como la capacidad para inhibir la actividad de la MPO, impidiendo la formación del potente oxidante HOCl (9-11). Durante estas prácticas, los alumnos mediréis la capacidad de inhibición de la MPO por indometacina (AINE) y un compuesto en estudio. Para la medida de la actividad enzimática de la MPO se seguirá el método propuesto por Bradley y col. (12), basado en la oxidación dependiente de H_2O_2 (donador de hidrógeno) de un donador artificial de electrones (orto-dianisidina), con producción de un cromógeno amarillo anaranjado cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente (Figura 5).

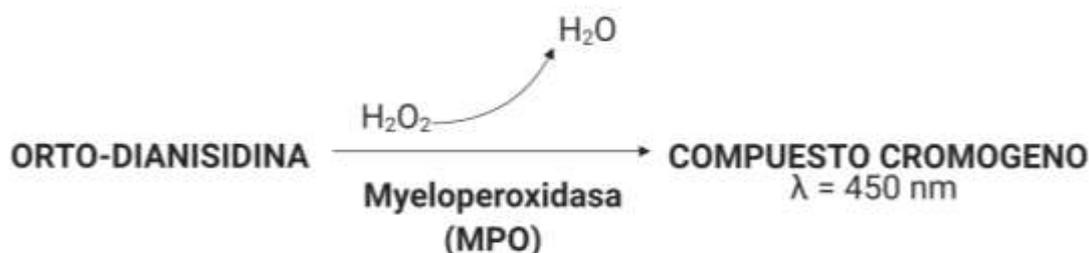


Figura 5. Reacción de oxidación de orto-dianisidina.

Protocolo de la determinación de la actividad de la mieloperoxidasa.

Se utilizará la línea celular HL60 (leucemia promielocítica aguda humana). Estas células expresan elevados niveles de MPO de forma basal, por ello se utilizarán como modelo para evaluar la capacidad de compuestos en estudio de inhibir a esta enzima.

Procedimiento de sembrado y tratamiento de las células para la obtención de las muestras.

- 1- En primer lugar, preparar una suspensión de células de 1 500 000 células/mL en medio cultivo RPMI-1640 completado previamente con 10% FBS y 1% Penicilina/Estreptomicina. Para ello, a cada pareja de alumnos se les entregará un Frasco de Roux con una suspensión de células y un falcon con medio cultivo completo. Cada pareja deberá contar la cantidad de células que hay y preparar la suspensión de células. Para el conteo, en la campana de flujo:
 - a. Agitar la suspensión de células con una pipeta serológica estéril de 5 ó 10 mL para tener una suspensión homogénea de células.
 - b. Coger 50 μL de la suspensión de células y añadirlo a un tubo eppendorf.
 - c. Añadir 50 μL de Azul de tripán a los 50 μL de la suspensión de células y mezclar suavemente para no destrozar las células. Coger 10 μL de la mezcla e introducirlo en una cámara de Neubauer o en un hemocitómetro para el conteo celular en el microscopio (fuera de la campana).

d. Observar y contar las células en el microscopio. El hemocitómetro utilizado consta de una cuadrícula central que consta de 9 cuadrados grandes que a su vez están divididos en otros 9 sub-cuadrados. Contar las células vivas que hay en 3 cuadrados grandes en diagonal (Figura 6). Las células vivas se distinguen con el azul de tripán utilizado previamente. El azul de tripán es un colorante que permite distinguir células vivas de células muertas, ya que es incapaz de atravesar la membrana celular. De esa forma, las células vivas con la membrana celular intacta no se tiñen, mientras que las células muertas se tiñen de azul. Se trata de un método de tinción por exclusión que permite contar el número de células viables que hay en la suspensión celular. El número de células total se calcula siguiendo la siguiente fórmula:

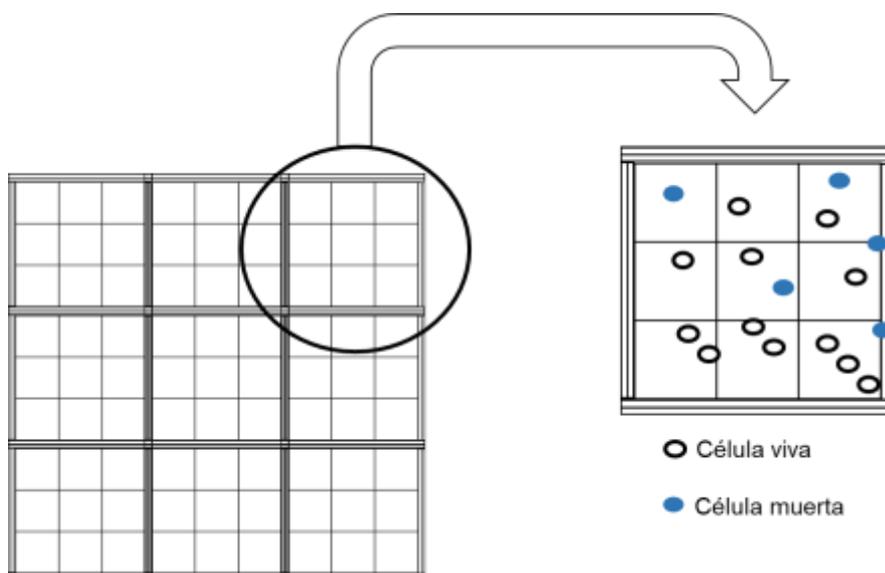
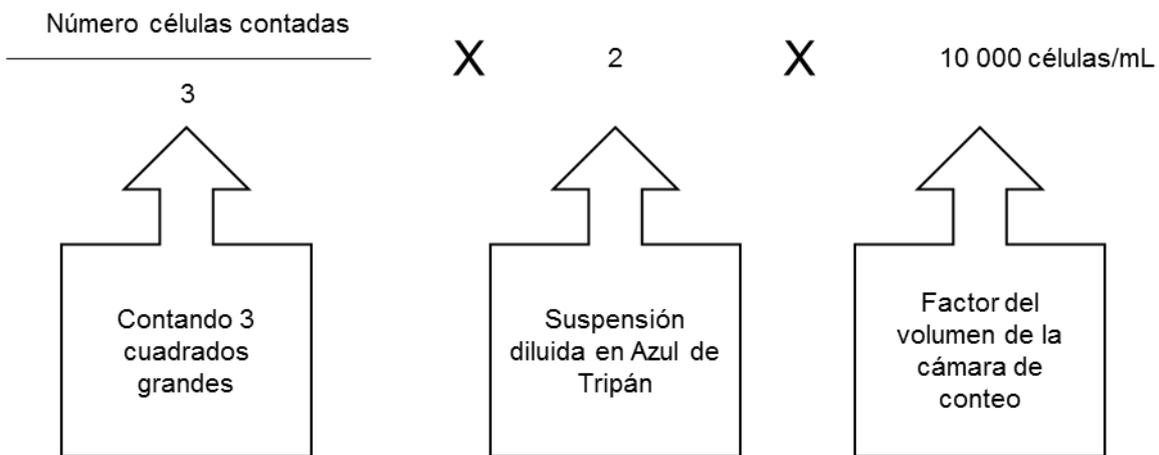


Figura 6. Representación de la cuadrícula de conteo de la cámara de conteo.

- e. Preparar una suspensión celular de trabajo de $1\,500\,000$ células/mL en un falcon estéril de 50 mL.
- 2- De la suspensión celular de trabajo preparada se deben sembrar $200\ \mu\text{L}$ /pocillo en una placa estéril de 96 pocillos de cultivo celular. Rellenar los pocillos de las filas B, C, D y E y columnas 2, 3, 4, 5 y 6 (Figura 7) con células.

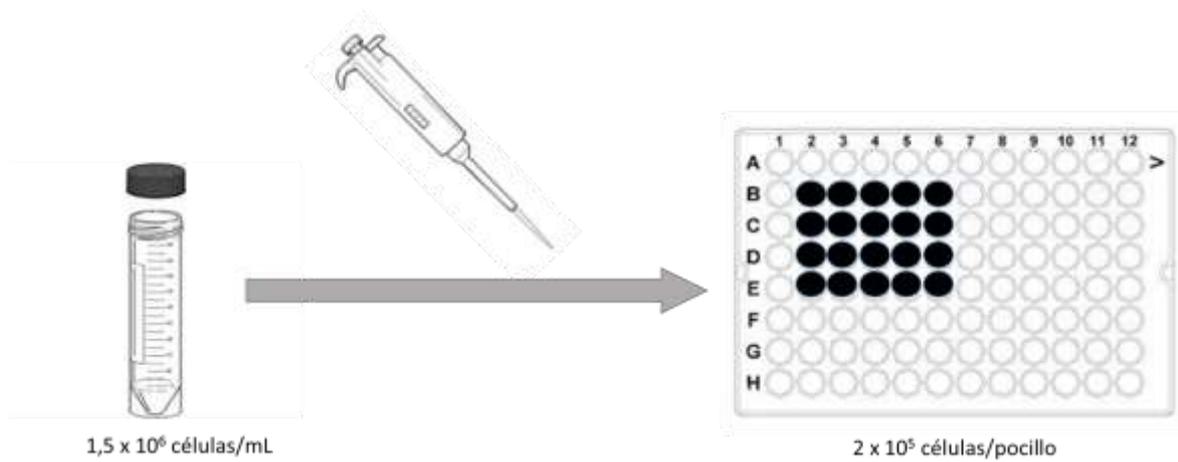
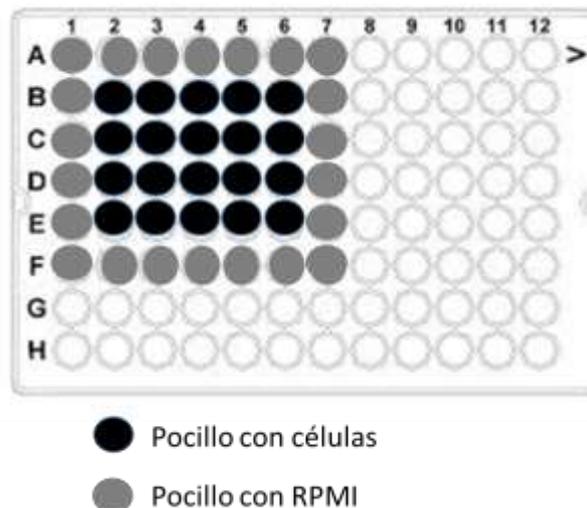


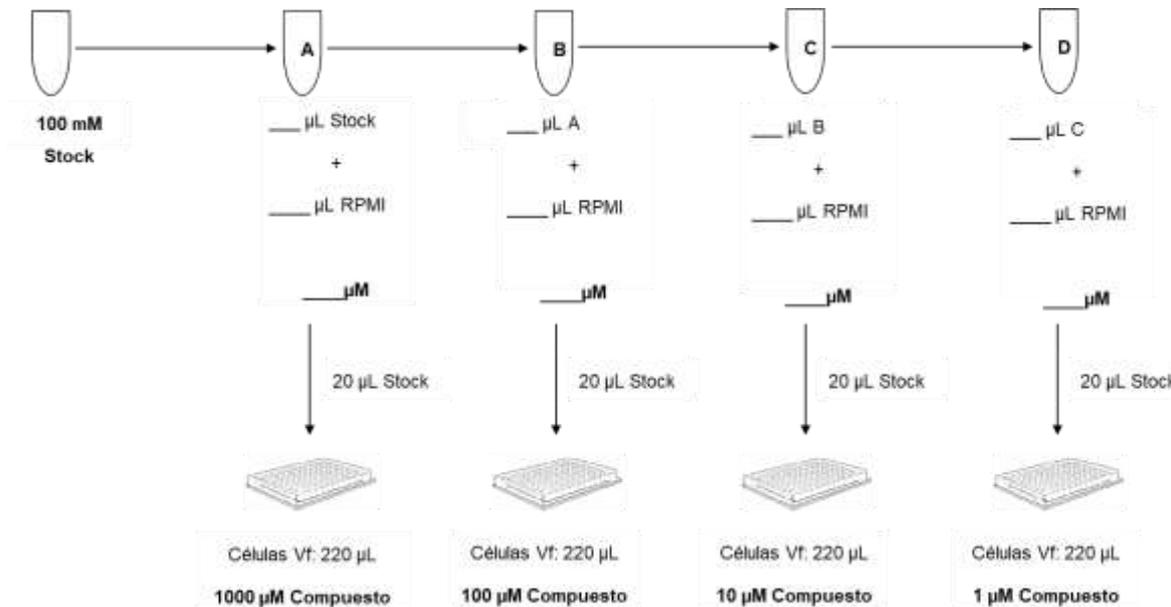
Figura 7. Esquema de llenado de la placa de 96 pocillos con células.

Para evitar que estos pocillos se evaporen, rellenar los pocillos de las filas A y F y los pocillos de las columnas 1 y 7 con $220\ \mu\text{L}$ /pocillo de medio RPMI. De esta forma, la placa debería quedar así:



- 3- Preparar diferentes diluciones de indometacina y/o el compuesto en estudio para tratar las células con diferentes concentraciones. Se deberá añadir $20\ \mu\text{L}$ /pocillo por tratamiento para tener un volumen final de $220\ \mu\text{L}$ /pocillo. Los alumnos debéis realizar los cálculos de las

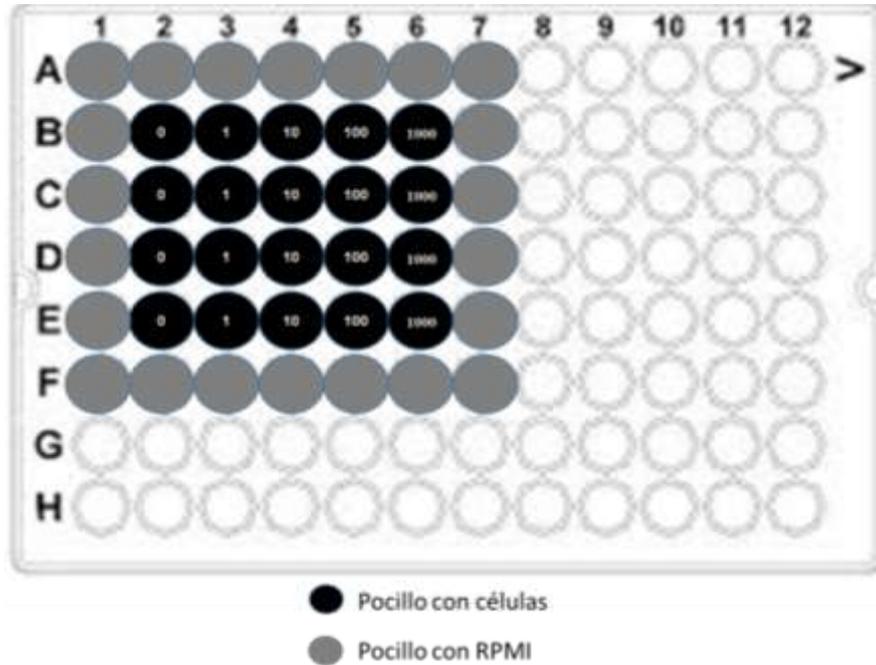
distintas diluciones que necesitaréis para tener concentraciones finales en los pocillos de 1000, 100, 10 y 1 μM del compuesto. El Stock inicial del compuesto está a 100 mM en



dimetilsulfóxido (DMSO). DMSO es un disolvente orgánico ampliamente utilizado para disolver compuestos, siendo tóxico para las células a concentraciones superiores de 1%. Por ello, las diluciones se realizarán en medio RPMI. El siguiente esquema es orientativo para la preparación de las diluciones:

Los tratamientos se pondrán en el siguiente orden en la placa de 96 pocillos:

- 1) Poner 20 μL /pocillo de medio RPMI a los pocillos de la columna 2. Esta columna serán los controles negativos, es decir, células sin tratamiento.
- 2) Poner 20 μL de la correspondiente disolución de compuesto en las columnas 3-6 para que las concentraciones finales en los pocillos sean 1, 10, 100 y 1000 μM :
 - i) Columna 3: 1 μM .
 - ii) Columna 4: 10 μM .
 - iii) Columna 5: 100 μM .



iv) Columna 6: 1000 μ M.

4- Incubar las placas en el incubador, durante 24 h.

Medición de la actividad de la MPO.

Tras 24 horas de tratamiento, se realizará la medición de la actividad de la MPO. Para ello se utilizarán solamente los pocillos de las filas B y C, dejando el resto de pocillos para la otra técnica a realizar.

Los pasos a seguir son los siguientes:

- 1- Recoger todo el contenido de cada pocillo de las filas B y C, con previa agitación con la micropipeta, y recolectarlo en eppendorfs de 1,5 mL. Cada pocillo es una muestra independiente, por lo que debe recolectarse en un eppendorf individual. Los pocillos sin células también deben recolectarse ya que serán tratados como “blancos”.
- 2- Guardar las muestras para MPO en el congelador de -20°C durante al menos 1 hora.
- 3- Preparar los reactivos de la siguiente forma:
 - a. En un matraz aforado preparar 25 ml de *orto-dianisidina* al 0.067 % p/v en *agua destilada* (16,75 mg/25 mL). Posteriormente, se divide dicho volumen en dos tubos falcon.
 - b. En un matraz aforado preparar 25 ml de *HETAB* 0,5 % p/v en *tampón fosfato pH 6.0* (125 mg/ 25 mL). Posteriormente, se divide dicho volumen en dos tubos falcon.
 - c. En un matraz aforado preparar *agua oxigenada* 0.003% v/v (9,09 μL *agua oxigenada*/50 mL *agua destilada*). Posteriormente, se divide dicho volumen en dos tubos falcon.
- 4- Tras 1 hora en el congelador, se permite el descongelado de las muestras a temperatura ambiente durante 5 min.
- 5- Las muestras se centrifugan 5 min a 300 G.
- 6- Una vez centrifugado, resuspender el pellet de células de forma que la suspensión de células rotas quede totalmente homogénea.
- 7- Colocar en una nueva placa de 96 pocillos las distintas muestras, según el siguiente esquema (Figura 8):
 - a. En los pocillos de la columna 1, se colocan 70 μL de la muestra Blanco (solamente medio de cultivo). Rellenar dos pocillos por muestra.
 - b. En los pocillos de la columna 2, se colocan 70 μL de las distintas MUESTRAS DE CÉLULAS SIN TRATAMIENTO (0 μM). Rellenar dos pocillos por muestra.
 - c. En los pocillos de la columna 3, se colocan 70 μL de las distintas MUESTRAS DE INDOMETACINA 10 μM o COMPUESTO 10 μM . Rellenar dos pocillos por muestra.
 - d. En los pocillos de la columna 4, se colocan 70 μL de las distintas MUESTRAS DE INDOMETACINA 100 μM o COMPUESTO 100 μM . Rellenar dos pocillos por muestra.
 - e. En los pocillos de la columna 5, se colocan 70 μL de las distintas MUESTRAS DE INDOMETACINA 1000 μM o COMPUESTO 100 μM . Rellenar dos pocillos por muestra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	0 μM INDO	10 μM INDO	100 μM INDO	1000 μM INDO	-	-	-	-	-	-	-
B	Blanco	0 μM INDO	10 μM INDO	100 μM INDO	1000 μM INDO	-	-	-	-	-	-	-
C	Blanco	0 μM Compuesto	10 μM Compuesto	100 μM Compuesto	1000 μM Compuesto	-	-	-	-	-	-	-
D	Blanco	0 μM	10 μM	100 μM	1000 μM	-	-	-	-	-	-	-

		Compuesto	Compuesto	Compuesto	Compuesto							
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 8: Esquema de la colocación de las distintas muestras en la placa de 96 pocillos.

8- Posteriormente se añaden sobre las muestras los siguientes reactivos:

- a. 70 μ L/pocillo de HETAB.
- b. 70 μ L/pocillo de orto-dianisidina.
- c. 70 μ L/pocillo de agua oxigenada.

Es muy importante seguir este orden para que la reacción ocurra. También es muy importante no formar burbujas en los pocillos durante el proceso.

9- Incubar las placas durante 5-10 min a temperatura ambiente.

10- Medir la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en el lector de placa.

Medición de la viabilidad celular.

En paralelo a la medición de la actividad de la MPO, es necesario medir la viabilidad celular, es decir, el porcentaje de células que están vivas tras el tratamiento. El objetivo de la práctica es conocer si el compuesto en estudio (en comparación con indometacina) inhibe la actividad de la MPO, pero es importante que las concentraciones utilizadas no sean tóxicas para las células. Esto es necesario porque si las concentraciones usadas fuesen tóxicas, habría menor número de células y, por tanto, la actividad de la MPO sería menor comparada a las muestras sin tratamiento, dando lugar a un resultado falso positivo.

Con el propósito de medir la viabilidad celular se utilizarán los pocillos de las filas D y E de la placa de células. Se ha escogido la técnica de la resazurina para la medición de la viabilidad celular. Se trata de un ensayo colorimétrico/fluorescente que se basa en la capacidad de las células viables en reducir el compuesto resazurina (de color azul) al producto resorufina (de color rosa) (14, 15). La cantidad de resorufina producida es proporcional al número de células viables, ya que las células no viables pierden rápidamente la capacidad metabólica y, por tanto, no pueden reducir a la resazurina. Cuando se utiliza como técnica fluorescente, se mide la señal emitida por la resorufina a 590 nm, ya que ésta es altamente fluorescente mientras que resazurina no lo es (Figura 9A). Cuando se utiliza como técnica colorimétrica, como se hará en estas prácticas, se basa en la diferencia que hay de absorbancia entre el producto resorufina (con pico máximo de absorbancia entre 540-570 nm) y el reactivo resazurina (con pico máximo de absorbancia próximo a 630 nm) (Figura 9B-C).

Los pasos a seguir serán:

- 1- Preparar 1 mL de Resazurina en medio de cultivo (240 μ L del stock 1 mg/mL resazurina en 760 μ L de RPMI).

- 2- Añadir 20 μL /pocillo de la solución de resazurina para una concentración final de 20 μg /pocillo. Añadir a todos los pocillos de las filas D y E. Es muy importante no formar burbujas durante el proceso.
- 3- Incubar las placas en el incubador entre 1 h – 2 h.
- 4- Medir la absorbancia a 540 nm y 630 nm en el lector de placa.

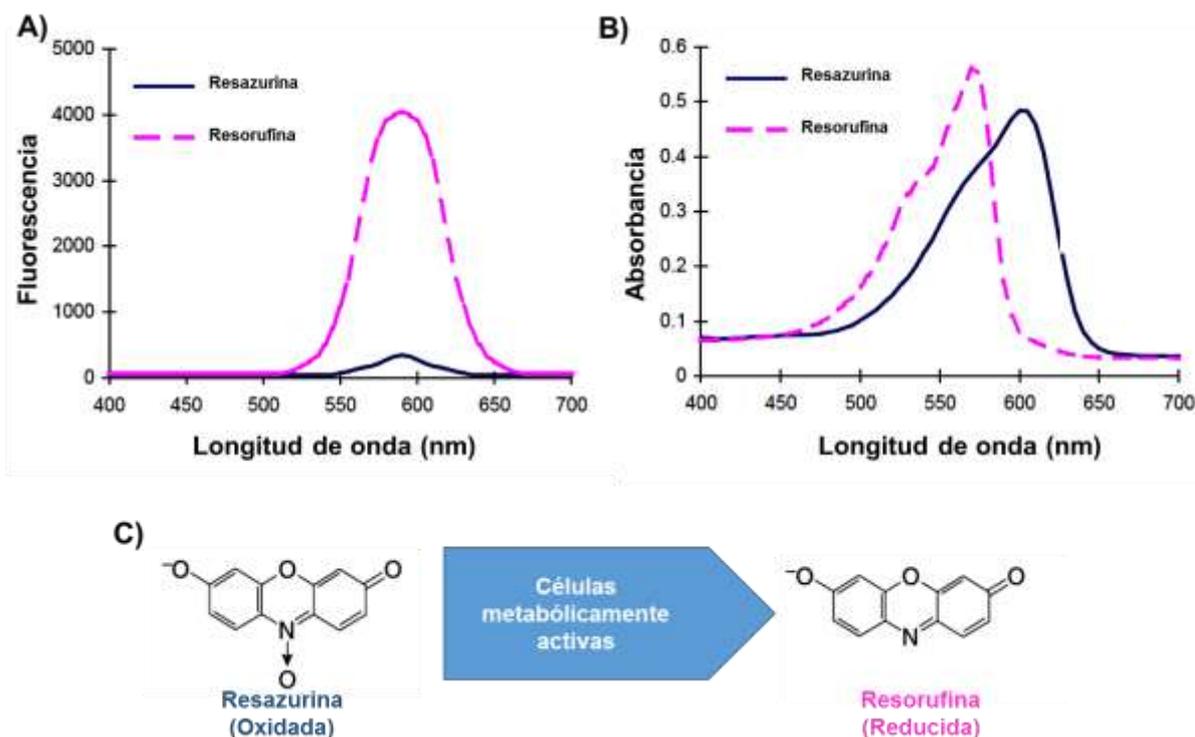


Figura 9. Diferencias entre las propiedades ópticas y fluorescentes de resazurina y resorufina. A) Ejemplo de fluorescencias de los compuestos puros. B) Ejemplo de absorbancias de los compuestos puros. C) Representación de la reacción que ocurre en células viables. Figura adaptada de Thermofisher (15).

Expresión de los resultados.

Los resultados obtenidos serán procesados en las sesiones informáticas. De forma resumida se realizarán los siguientes cálculos matemáticos.

Expresión de los resultados de la actividad de la MPO.

Los resultados pueden ser expresados como porcentaje (%) de actividad de la enzima MPO o como % de inhibición de la actividad de dicha enzima.

Para obtener el % de la actividad de la MPO se tendrá en cuenta que los valores de absorbancia de las células sin tratamiento corresponderán al máximo de respuesta, es decir al 100% de la actividad de MPO. De esta forma se calculará el % de actividad para cada muestra:

- 1- En primer lugar, a cada valor de absorbancia de las muestras se le restará el valor de absorbancia del Blanco (absorbancia de la mezcla de los reactivos sin células).

$$\text{Absorbancia MUESTRA} = \text{Absorbancia } 450 \text{ nm}^{\text{MUESTRA}} - \text{Absorbancia } 450 \text{ nm}^{\text{BLANCO}}$$

- 2- El % de actividad de MPO de cada muestra se calculará por regla de tres:

Absorbancia *Células sin tratamiento* (0 μM indometacina) ----- 100%

Absorbancia *MUESTRA* ----- X

- 3- El % de inhibición de la actividad de MPO se calcula:

$$\% \text{ Actividad MPO } \textit{Células sin tratamiento} - \% \text{ Actividad MPO } \textit{MUESTRA}$$

Los resultados se expresarán como la media de los valores obtenidos (media \pm error), pudiéndose representar como una tabla o como una gráfica (ver figura 10).

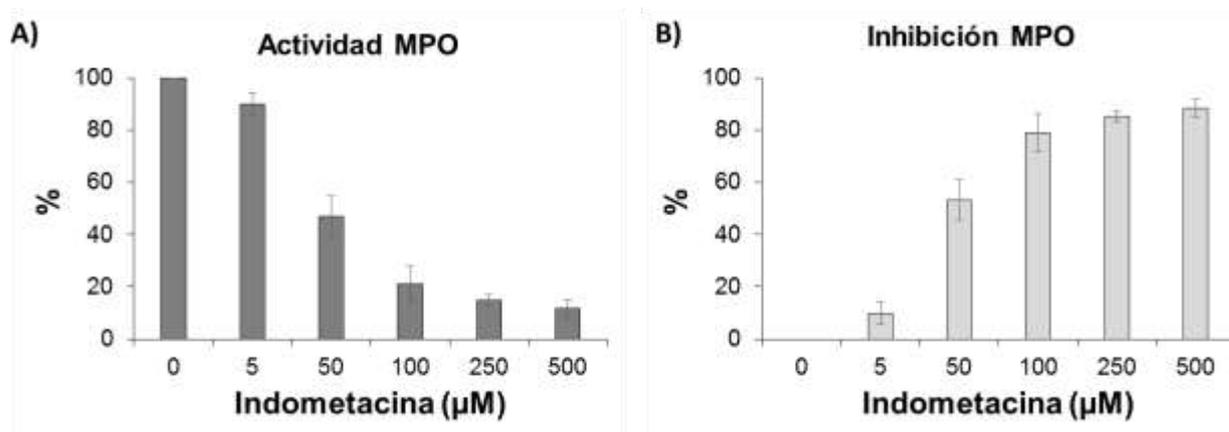


Figura 10. Ejemplo de valoración del efecto de indometacina sobre la actividad de MPO. A) Porcentaje de actividad de la MPO. B) Porcentaje de inhibición de la MPO.

Expresión de los resultados de la viabilidad celular.

Los resultados finales de la práctica se expresarán como porcentaje (%) de viabilidad celular. Para calcular este porcentaje en primer lugar se debe calcular la absorbancia final de cada muestra de la siguiente manera:

$$\text{Absorbancia final}^{\text{MUESTRA}} = \text{Absorbancia MUESTRA } 540 \text{ nm} - (\text{Absorbancia MUESTRA } 630 \text{ nm} \times \text{CC})$$

El valor de absorbancia final obtenido corresponde a la absorbancia de la cantidad de resorufina producida por las células viables en esa muestra. En dicha fórmula:

- Absorbancia MUESTRA 540 nm = Absorbancia 540 nm^{MUESTRA} - Absorbancia 540nm^{MEDIO SÓLO}

- Absorbancia MUESTRA 630 nm = Absorbancia 630 nm^{MUESTRA} - Absorbancia 630 nm^{MEDIO SÓLO}

$$CC \text{ (Coeficiente de corrección)} = \frac{\text{Absorbancia } 540 \text{ nm}^{\text{MEDIO CON RESAZURINA}} - \text{Absorbancia } 540 \text{ nm}^{\text{MEDIO SÓLO}}}{\text{Absorbancia } 630 \text{ nm}^{\text{MEDIO CON RESAZURINA}} - \text{Absorbancia } 630 \text{ nm}^{\text{MEDIO SÓLO}}}$$

Los resultados se expresan según la media de los valores obtenidos (media ± error) como porcentaje de viabilidad celular, teniendo en cuenta que el 100% de viabilidad corresponderá al valor de absorbancia final de las células sin tratamiento.

$$\frac{\text{Absorbancia final}^{\text{CÉLULAS SIN TRATAMIENTO}}}{\text{Absorbancia final}^{\text{MUESTRA}}} \times 100\% = X$$

De esta forma se obtendrán los valores de viabilidad celular para cada concentración de indometacina, pudiendo expresar los datos como una tabla o como una gráfica. En la figura 11 se muestra un ejemplo de gráfica de viabilidad celular.

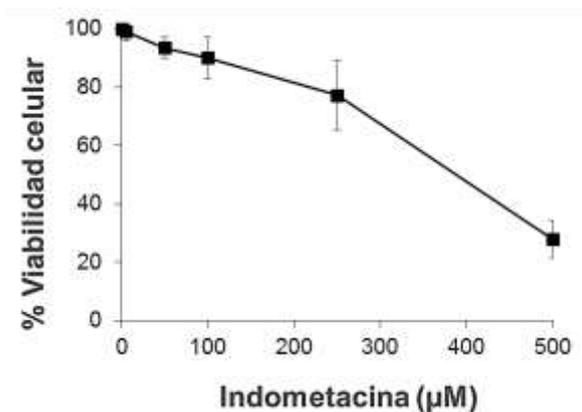
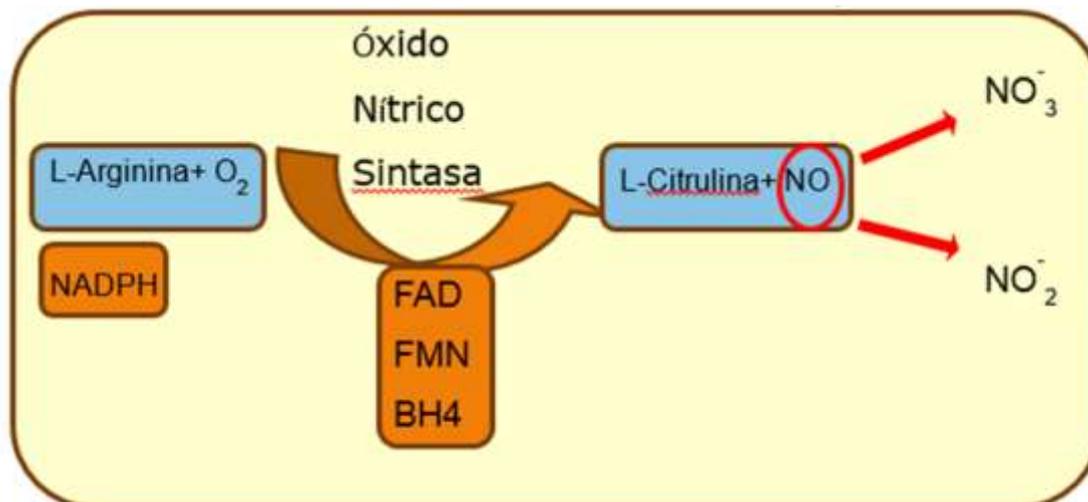


Figura 11. Ejemplo de viabilidad celular de células expuestas a indometacina durante 24 horas.

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El NO es un radical libre gaseoso que en los mamíferos se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima NO sintasa (NOS). Se trata de una reacción molecular compleja que necesita oxígeno molecular y coenzimas como la tetrahidrobiopterina, NADPH, FAD y FMN (Figura 12). Como productos de la reacción aparecen el NO y L-citrulina. En condiciones aerobias, el NO se oxida espontáneamente formando metabolitos más estables como son nitratos y nitritos. Este radical libre



gaseoso difunde fácilmente desde las células donde se produce a las células musculares lisas.

Figura 12. Papel de la NOS en la generación de NO.

Existen tres isoenzimas de NOS: inducible (iNOS), neuronal constitutiva (nNOS) y endotelial constitutiva (eNOS). Las isoenzimas constitutivas generan pequeñas cantidades de NO (del orden de nM), mientras que la isoforma iNOS produce cantidades mucho mayores (del orden de μM) que caracterizan algunos estados patológicos en los que se induce la expresión de esta enzima. La iNOS se expresa en macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, musculatura lisa y células endoteliales en respuesta a diversos estímulos inmunológicos como el IF- γ o el TNF- α (Figura 13). También es

inducido por el propio lipopolisacárido bacteriano a través de la activación del NF- $\kappa\beta$.

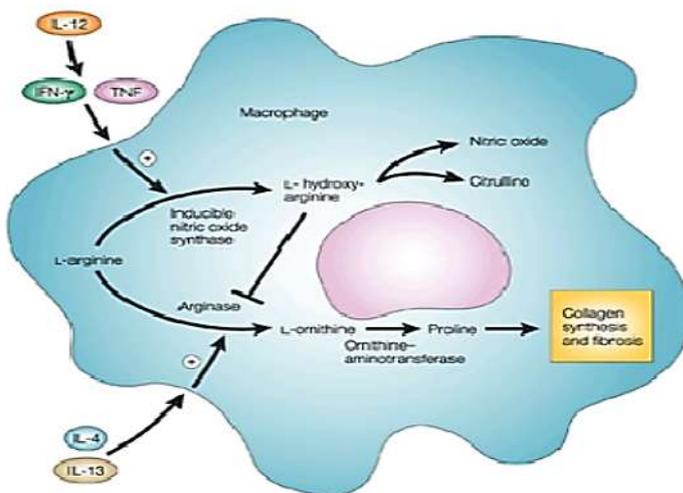


Figura 13. Inducción de iNOS en leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos y macrófagos).

El NO tiene dos principales funciones en el organismo: homeostasis y citotoxicidad (16). En condiciones fisiológicas normales, el NO es producido a bajas concentraciones por la iNOS constitutiva y participa en numerosos procesos fisiológicos: vasodilatación, agregación plaquetaria, neurotransmisión,... Sin embargo, en procesos patológicos, el NO es producido a altas concentraciones por la iNOS inducible en macrófagos, neutrófilos y hepatocitos (entre otras células), formando parte de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. En estas situaciones, el NO presenta actividad citotóxica y participa en la inhibición de la proliferación y eliminación de patógenos. Sin embargo, estas elevadas concentraciones de NO también pueden dañar el propio tejido del organismo, estando relacionado con numerosos procesos patológicos, incluyendo todas las enfermedades gastro-intestinales inflamatorias crónicas, como la úlcera péptica y la gastritis crónica, entre otras.

Es por ello que la inhibición de la actividad y/o reducción de la expresión de la iNOS puede participar entre los mecanismos antiinflamatorios de fármacos como los AINEs y los glucocorticoides (16-17).

1.1.1. Determinación de concentración de óxido nítrico.

Se utilizarán muestras obtenidas tras la exposición a los tratamientos de células HL60 diferenciadas. Estas células pueden ser diferenciadas a “células similares a macrófagos” a través de la exposición a forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) durante 3-4 días (18). Una vez diferenciadas, estas células expresan iNOS y, por tanto, elevados niveles de NO. Tras su diferenciación, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del compuesto en estudio o a indometacina durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, se recogió todo el contenido de cada pocillo en eppendorfs de 1,5 mL y se centrifugó, tras lo cual se recolectó únicamente el sobrenadante.

1.3.1.1 Detección de óxido nítrico.

La determinación del radical NO por sí sólo, es difícil debido a su naturaleza como radical y su corta vida media. Por lo tanto, la medida de la producción del radical NO se realiza mediante la determinación de productos finales del NO, nitratos y nitritos. Estas medidas se llevan a cabo con la Reacción de Griess, basada en la determinación de nitritos.

Una alícuota de 10 µl de muestra se adiciona a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. A continuación, se añaden 5 µl de nitrato reductasa (10 U/ml), 5 µl de tampón HEPES (0,5 M), 5 µl de FAD (0,05 mM), 5 µl de NADPH (1 mM) y 60 µl de agua destilada. Incubamos a 37 °C durante 15 minutos.

Posteriormente se incorpora 5 µl de láctico deshidrogenada (1500 U/ml) y 5 µl de ácido pirúvico (100 mM), con objeto de consumir el NADPH no utilizado por la nitrato reductasa, se incuba a 37 °C durante 5 min.

Se colocan 100 µl de cada una de las muestras de la curva patrón en la columna 1.

Finalmente se añaden 100 µl de Reactivo de Griess, y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente, realizando la determinación espectrofotométrica a 490 nm, en el lector de placas.

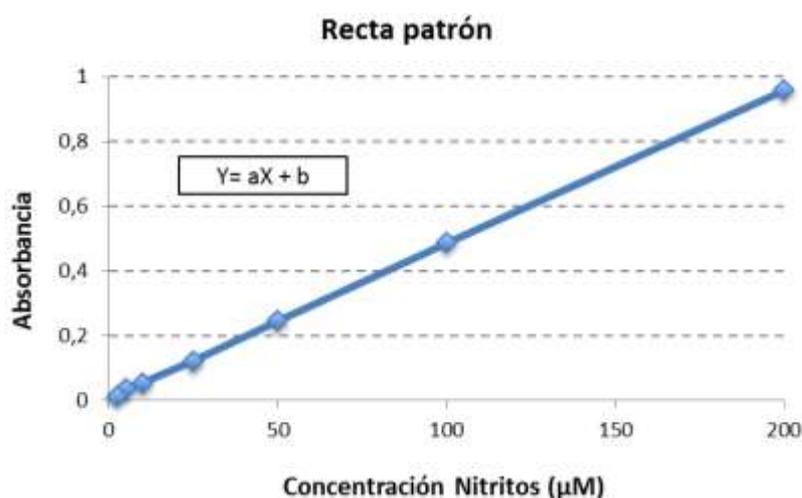
Los valores de nitritos se interpolan en la pendiente de la curva patrón elaborado y se expresan como concentración (µM) de nitritos en la muestra.

Ejemplo distribución de las muestras en la placa:

	1	2	3	4	5
A	Blanco	0 µM INDO	10 µM INDO	100 µM INDO	1000 µM INDO
B	P _{2.5}	0 µM INDO	10 µM INDO	100 µM INDO	1000 µM INDO
C	P ₅	0 µM Compuesto	10 µM Compuesto	100 µM Compuesto	1000 µM Compuesto
D	P ₁₀	0 µM Compuesto	10 µM Compuesto	100 µM Compuesto	1000 µM Compuesto
E	P ₂₅				
F	P ₅₀				
G	P ₁₀₀				
H	P ₂₀₀				

Resumen del Protocolo:

1. Se añaden 10 µl del blanco (pocillo A1) ó 10 µl de las muestras (pocillos de columnas 2-5)
2. Sobre las muestras se añaden: 5 µl de nitrato reductasa, 5 µl de tampón HEPES, 5 µl de la solución de FAD, 5 µl de solución de NADPH y 60 µl de agua destilada.
3. Se incuba a 37 °C durante 5 minutos.
4. Se añaden sobre las muestras: 5 µl de lactato deshidrogenasa y 5 µl de solución de ácido pirúvico.
5. Se incuba a 37 °C durante 5 minutos.
6. Se añaden 100 µl de cada una de las muestras de la curva patrón: P200, P100, P50, P25, P10, P5, P2.5. La Figura 15 muestra el esquema de preparación de las muestras para la curva patrón.
7. Se añade sobre todos los pocillos 100 µl del Reactivo de Griess
8. Se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos
9. Determinación espectrofotométrica a 490 nm.
10. Los valores de nitritos se obtendrán de una recta patrón previamente elaborada por regresión lineal según se muestra en la Figura 14. Se expresan como concentración (µM) de nitrit



lineal según se muestra en la Figura 14. Se expresan como concentración (µM) de nitrit

Figura 14. Ejemplo de recta patrón elaborada a partir de las absorbancias obtenidas de muestras de nitritos preparadas en el laboratorio. A partir de la recta patrón se obtiene la ecuación principal de la recta $Y = aX + b$ que se utilizará para obtener los valores de Nitritos en las muestras tratadas con indometacina o con el compuesto en estudio. $Y =$ Absorbancia; $X =$ Concentración (µM); $a =$ pendiente y $b =$ corte con el eje de las ordenadas (Y).

1.3.1.2. Expresión de los resultados de la producción de óxido nítrico (ON)

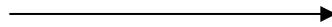
Los resultados serán expresados como concentración de nitritos liberada por las células tratadas en µM por cada dosis de compuesto experimentado y de indometacina o porcentaje (%) de concentración de nitritos liberada respecto a la cantidad de nitritos liberada por las células control o sin tratar.

Figura 15. Esquema curva de patrón para nitritos



200 μL NaNO_2
+
4800 μL PBS

1000 μL +1000 μL PBS



10 μM

750 μL +750 μL PBS



50 μM

125 μL +1125 μL PBS



5 μM

375 μL +375 μL PBS



25 μM

125 μL +1125 μL PBS



2.5 μM

2. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD PSICOTROPA DE FÁRMACOS EN ENSAYOS *IN VIVO*

2. VALORACIÓN DE FÁRMACOS PSICOTROPOS

INTRODUCCIÓN

Los psicofármacos son sustancias que deprimen, estimulan o alteran la naturaleza de la conducta y/o de las reacciones emocionales y por ello son empleados en el tratamiento de las enfermedades mentales.

Tanto en animales como en el hombre no existe un criterio único que permita clasificar un fármaco psicotrópico, siendo necesaria una verdadera batería de métodos de estudio. Los métodos de investigación básica, aunque presentan un valor provisional dada la dificultad en la extrapolación de resultados obtenidos desde el animal de experimentación hacia el hombre, permiten valorar moléculas seleccionadas con potencial aplicación terapéutica.

A continuación, se describen los métodos principales.

Pruebas de Comportamiento general

➤ *Esquema de Irwin*

En la valoración preliminar de nuevos fármacos posiblemente activos sobre SNC ocupa un lugar destacado el Esquema de Irwin. Su sencilla realización, así como la suficiente validez de los datos aportados hacen que su práctica sea de gran utilidad antes de proseguir la investigación con pruebas de mayor complejidad. El desarrollo de esta batería de ensayos quedaría resumido en tres grandes apartados:

Estudio de comportamiento (alerta, aseo, irritabilidad)

Estudio neurológico (temblores, convulsiones, ataxia)

Estudios relacionados con el SNA (salivación, hipotermia, midriasis)

➤ *Efecto de "Doma"*

Animales naturalmente hostiles como el mono rhesus, pueden adquirir un comportamiento normal, fáciles de manejar, cooperativos, por acción de fármacos con acción tranquilizante.

➤ *Facilitación de hipnóticos.*

Un efecto común de los tranquilizantes mayores es la facilitación de los hipnóticos y de los anestésicos generales que se pone de relevancia por la prolongación de la actividad de los mismos.

➤ *Reacción emocional.*

En determinado espacio especialmente indicado para este tipo de experimentación, caja de campos, se valora la mayor o menor sensibilidad y adaptación del animal ante las nuevas circunstancias ambientales. Además de observar la actividad motora desarrollada por el animal, es útil y sencillo anotar el número de defecaciones producidas.

Actividad motora

La acción de fármacos tranquilizantes y relajantes musculares, activos a nivel central, puede ser estudiada ensayando las modificaciones inducidas en modelos relacionados con la actividad motora.

➤ *Actógrafos*

La motilidad espontánea del animal se cuantifica mediante aparatos denominados actógrafos.

El más sencillo consistiría en una jaula ligera suspendida de un soporte cuyos movimientos son registrados. Existen sistemas más complejos compuestos de células fotoeléctricas sensibilizadas en relación con la actividad del animal.

➤ *Trastornos de la marcha*

Se registran los cambios producidos en la marcha del animal previamente impregnado con determinado colorante en sus extremidades. Las marcas producidas presentarían ciertos cambios o irregularidades cuando el animal sufre ataxia.

➤ *Prueba del cilindro rotatorio (Rota-Rod)*

Consiste en un cilindro con capacidad de giro según determinadas condiciones previamente establecidas. Se registra el tiempo que tarda en caer el animal.

➤ *Prueba de la chimenea*

Se introduce el animal, ratón, en un tubo de vidrio con la cabeza hacia abajo, anotando el tiempo que tarda en recobrar la posición normal.

- *Estudio sobre cambios catatónico o catalépticos.*

Moléculas con acción neuroléptica tienen la propiedad de producir en los animales un estado caracterizado por la permanencia de los mismos en posiciones anormales.

- *Excitación provocada*

El estudio de agentes con posible acción anticonvulsivante puede realizarse estimulando previamente al animal con fármacos como estricnina, picrotoxina o cardiazol, productores de convulsiones de diferentes características, y ver la acción antagonista del fármaco en estudio.

- *Pruebas de tracción, evasión y curiosidad.*

Ensayos sobre aprendizaje y memoria

Además de los ensayos anteriormente citados, los estudios se pueden completar con otros test neurofarmacológicos relacionados con los cambios en conducta exploratoria y emocional.

- *Prueba del laberinto.*

Los laberintos pueden ser de distinta complejidad e incluso introducir determinada recompensa.

Anotaríamos el tiempo que tarda en encontrar la salida, así como el número de errores cometidos. Previamente el animal habrá sido sometido a un periodo de aprendizaje.

- *Autoestimulación*

Esta técnica consiste en implantar electrodos permanentes en determinados centros cerebrales del animal y conectados a un dispositivo por el cual reciben determinadas descargas eléctricas al presionar una palanca. Los animales curiosamente reciben satisfacción al autoestimularse. Algunos fármacos alteran la velocidad de esas estimulaciones en distintas zonas del cerebro, como es el caso del ratón y las anfetaminas o el gato y la morfina.

Reflejos condicionados

- *Respuesta de fuga y evitación*

El animal, normalmente rata, es colocado en una jaula cuya base recibe una descarga eléctrica de determinadas condiciones preestablecidas y algo dolorosas. Posteriormente, la rata es sometida a una fase de aprendizaje enseñándola a evitar la descarga pasando antes al compartimento próximo, concretamente al observar determinada señal de aviso como puede ser un timbre o una luz. Este tipo de ensayo son especialmente útiles en la valoración de fármacos antidepresivos. Los animales

por tanto han de sufrir previamente determinada alteración neurológica que se aproxime a un posible cuadro depresivo. Es útil entonces utilizar el modelo de “shock inescapable” consistente en sesiones diarias de descargas eléctricas y que terminan generando en el animal un cuadro de estrés emocional.

Este conjunto de pruebas son algunas de las que podrían realizarse para valoración de fármacos activos sobre el SNC. No obstante, el estudio completo, profundizando en su mecanismo de acción, necesitaría pruebas más concretas y sofisticadas de tipo electrofisiológico (EEG), bioquímico (actividad sobre determinados enzimas, binding en receptores cerebrales) o anatomopatológicos

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y sustancias ensayadas

Se toman dos grupos de ratones (n=12)

1. Grupo Control (vehículo, solución salina fisiológica)
2. Grupo tratado con el fármaco psicodpresor- Diazepam (2mg/Kg)

A cada animal (uno por alumno) se le aplica, vía i.p. 0.25 ml de las soluciones de los fármacos en estudio. Mantendremos una secuencia de 15 min entre cada animal.

Pasados 30 min se procede a la valoración de los cambios inducidos según los tipos de test propuestos. Las pruebas han de hacerse en silencio máximo, siendo imprescindible que la manipulación se intente realizar en idénticas condiciones para todos los animales.

TEST

➤ **Test de la curiosidad (Test de Boisier-Simon)**

En primer lugar, cada animal es colocado en el centro de la superficie con orificios, una secuencia total de aplicación de 5 min. El sistema de registro del equipo contabiliza el número de veces que introduce la cabeza de forma contundente en los orificios, mediante detección de células fotovoltaicas localizadas en la parte inferior. Los resultados se anotarán cada minuto, durante los cinco minutos que dura la prueba. Posteriormente, representamos el nº de veces por minuto que el animal introduce la cabeza en el orificio, obteniendo un total de 5 valores por cada animal.

➤ **Test de la Actividad Motora Espontánea (Actímetro)**

El actímetro mide la motilidad del animal a través de un sistema de sensores. Se contabilizará el número de movimientos del animal mediante un actímetro. Se contabilizarán intervalos de 5 minutos (0-5, 5-10 y 10-15) por un periodo total de 15 minutos.

➤ **Test de la Coordinación Motora (Rota-Rod)**

Consiste en medir el tiempo que el animal es capaz de mantenerse sobre un cilindro que gira a una velocidad constante de 5 r.p.m. Un fármaco que afecte a la coordinación motora reducirá este tiempo.

➤ **Test de la Tracción (Julon-Courvoisier)**

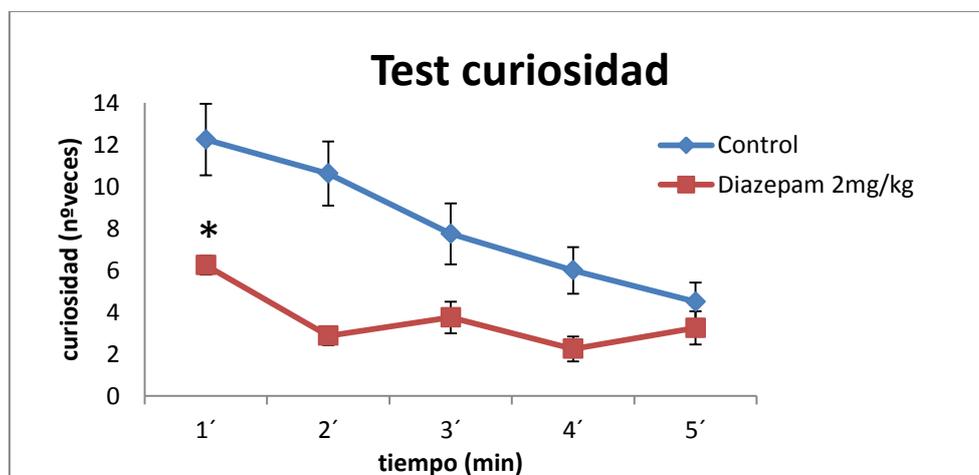
Utilizaremos un alambre horizontal del que colgaremos al ratón por las extremidades anteriores. Anotaremos el tiempo que tarda en caer dentro del tiempo asignado a la prueba (120 s).

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

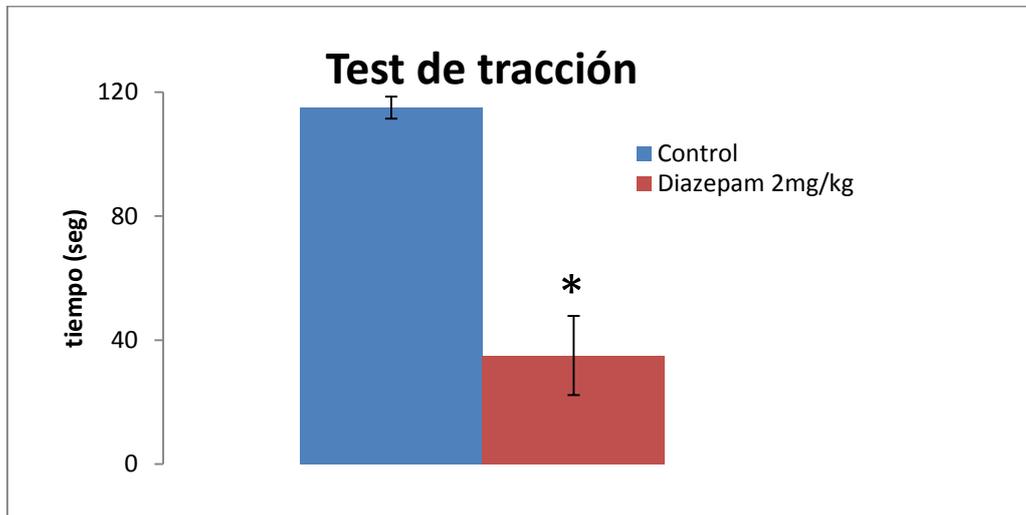
Representación gráfica

A partir de los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados, se calcula la media \pm error standard para cada grupo.

TEST DE LA CURIOSIDAD realizaremos un gráfico en el cual representamos en abscisas los minutos (de 1 a 5) que ha durado la prueba y en ordenadas los valores de las medias (\pm error estándar) de los resultados obtenidos en cada minuto. Obtendremos dos tipos de respuesta relacionados con los dos tratamientos a los que hemos sometido a los animales (grupo control y grupo diazepam).

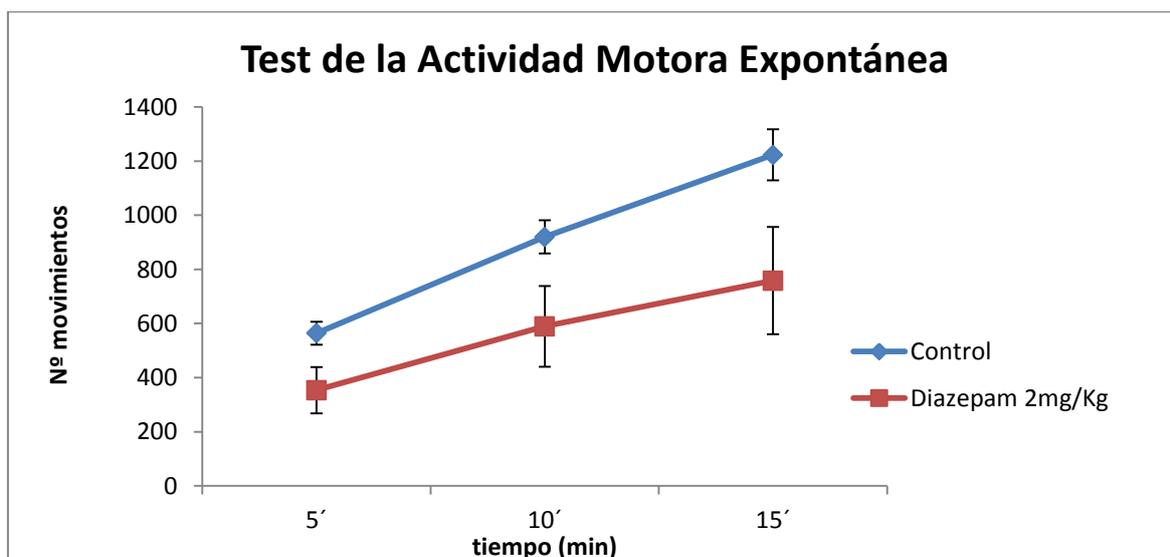


TEST DE LA TRACCIÓN calcularemos la media de los valores obtenidos con los dos grupos (\pm error estándar) y los resultados los representamos en un gráfico tipo histograma (gráfico de barras).

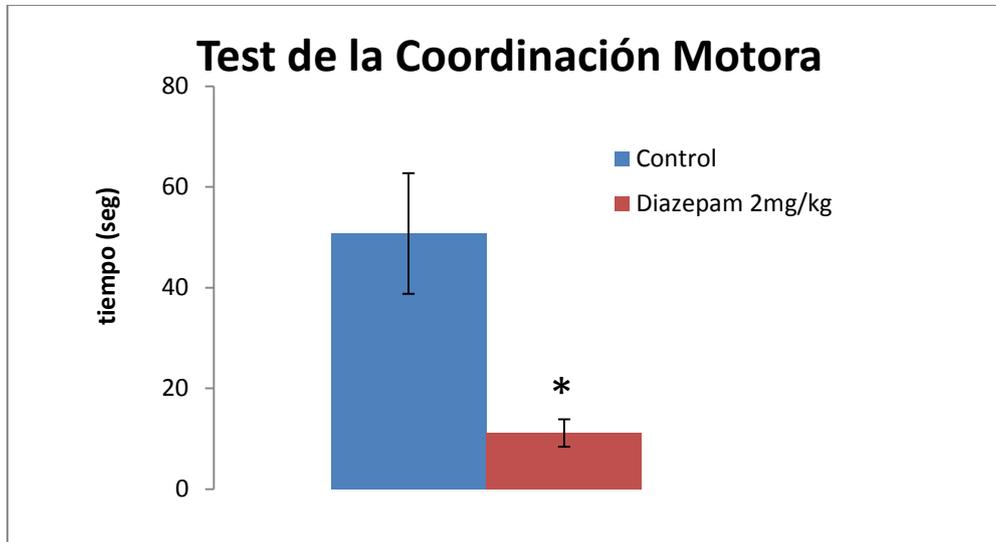


TEST DE LA ACTIVIDAD MOTORA ESPONTÁNEA

Realizaremos un gráfico en el cual representamos en abscisas los intervalos en minutos (0-5, 5-10, 10-15 min.) que ha durado la prueba y en ordenadas los valores de las medias (\pm error estándar) de los resultados obtenidos en cada intervalo.



TEST DE LA COORDINACION MOTORA calcularemos la media de los valores obtenidos en la prueba del Rota-Rod con los dos grupos (\pm error estándar) y los resultados los representamos en un gráfico tipo histograma (gráfico de barras)



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico nos permite conocer si las diferencias observadas entre los resultados de los dos grupos de animales son significativas o no. Si las diferencias fueran efectivamente significativas podríamos afirmar que diazepam disminuye la curiosidad y tracción de los animales. Asimismo, podríamos asegurar que diazepam disminuye la actividad motora, ya que estas pruebas evalúan dicha capacidad.

Las diferencias que observemos a simple vista no tienen por qué ser significativas, es necesario la realización de pruebas matemático-estadísticas que nos confirmen que todos los resultados de un grupo se parecen entre sí y que son distintos de los de otro grupo.

Los conceptos que vamos a manejar para ello son los siguientes:

Media: $\bar{X} = \sum X_i / n$

Error estándar: $ES = \delta_{n-1} / \sqrt{n}$

Desviación estándar: $\delta_{n-1} = \sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 / (n - 1)}$

Grado de libertad: $g.l. = n - 1$

Debemos elegir correctamente la prueba de significación más adecuada para nuestro experimento. El test adecuado para este tipo de prueba es el de la **t de Student** (seudónimo que

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Golan D.E., Armstrong E.J., Armstrong A.W. Principios de farmacología. Bases Fisiopatológicas del tratamiento farmacológico. 4ª Edición. Wolters Kluwer. Barcelona 2017.
2. Flórez J. Farmacología Humana. 6ª edición. Elsevier, Barcelona 2014.
3. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;10:427-439.
4. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953-964.
5. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011;11:762-774.
6. Ivanenkov YA, Balakin KV, Lavrovsky Y. Small molecule inhibitors of nf-kb and jak/stat signal transduction pathways as promising anti-inflammatory therapeutics. *Mini Rev Med Chem* 2011;11:55-78.
7. Birnie GD. The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br. J. Cancer* 1988; 58:41-45.
8. Aratini Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys.* 2018; 640:47-52.
9. Nève J, Parij N, Moguevsky N. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. *Eur J Pharmacol.* 2001;417(1-2):37-43.
10. Shacter E, Lopez RL, Pati S. Inhibition of the myeloperoxidase-H₂O₂-Cl⁻ system of neutrophils by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol.* 1991;41:975-84.
11. Paino IM, Ximenes VF, Fonseca LM, Kanegae MP, Khalil NM, Brunetti IL. Effect of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:543-51.
12. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78:206-9.
13. Cultek. Cultivos Celulares. 2007.
14. Silva FSG, Starostina IG, Ivanova VV, Rizvanov AA, Oliveira PJ, Pereira SP. Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. *Curr. Protoc. Toxicol.* 2016; 68:2.24.1-2.24.15.
15. Thermofisher. Manual de instrucciones de Alarm Blue. Consultado en mayo 2019. Disponible en línea en: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_TI%20alarmaBlue%20Rev%201.1.pdf
16. Kim, SF. The role of nitric oxide in prostaglandin biology; update. *Nitric Oxide.* 2011; 25:255–264.

17. Hämäläinen M, Lilja R, Kankaanranta H, Moilanen E. Inhibition of iNOS expression and NO production by anti-inflammatory steroids. Reversal by histone deacetylase inhibitors. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21:331-9.
18. Kawase T, Orikasa M, Oguro A, Burns DM. Up-regulation of inducible Nitric Oxide (NO) Synthase and NO production in HL-60 cells stimulated to differentiate by phorbol 12-myristate 13-acetate plus 1,25-dihydroxyvitamin d3 is not obtained with dimethylsulfoxide plus 1,25-dihydroxyvitamin d3. *Calcif Tissue Int.* 1998; 63:27–35.