

*Excmo. Sr. Director,*

*Excmos. Sres. Académicos*

*Señoras y señores:*

Hace un año, muy cerca de aquí, en la calle Arrieta nº 12, pronunciaba el Discurso de Apertura del año 1998 en la Real Academia Nacional de Medicina. El momento y las circunstancias eran las mismas que ahora. Tanto entonces como ahora decía, y digo, que me SIENTO afortunado por tener el HONOR de pronunciar el DISCURSO DE APERTURA DEL CURSO 1999 DE LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA. Como todos sabemos recibo este HONOR no por méritos propios, ni porque se den en mí circunstancias especiales que me hagan acreedor del mismo. Pronunciar el Discurso de Apertura es una obligada y grata tarea que tenemos todos los Académicos, tarea que debemos realizar siguiendo un turno rotatorio.

Acepté complacido, con extrema ilusión y hasta con orgullo, los hombres somos muy orgullosos, acepté digo este mandato que en su día me hizo el Director de la Real Academia y la Junta Directiva. Estos sentimientos de complacencia pronto se vieron reemplazados por fuertes sentimientos de responsabilidad porque, este DISCURSO, debe estar a la altura de los Discursos pronunciados por los Académicos que en años anteriores me han precedido. Quiero que mis primeras palabras sirvan para tranquilizar a todos los miembros de esta Real Academia de Farmacia y decirles que me he esforzado al máximo para que mi Discurso esté a la altura que debe, a la altura de las circunstancias. DESEO Y ESPERO que haya podido cumplir plenamente mi intención.

---

Agradezco a la Srta. Margarita García la extraordinaria ayuda prestada durante la preparación de este Discurso.

El primer interrogante que me surgió, al aceptar el mandato del Director, fue el de la elección del tema. En una Real Academia en la que la investigación es la principal característica de sus miembros, traer un tema de investigación hubiese sido para mí un desideratum, pero yo soy fundamentalmente un médico clínico, por esto me pareció adecuado traer aquí un tema que formase parte de la patología con la que a diario me encuentro, pero al mismo tiempo que tuviese una importante proyección en el campo de la terapia farmacológica, ya que ésta es más propia de los quehaceres de esta Real Academia a la que me honro en pertenecer.

Me atrevo a decir que la INFLAMACIÓN, con mayor o menor intensidad, forma parte del sustrato patogenético y morfopatológico de las enfermedades, incluso está presente en las degenerativas, algunas muy aparentemente alejadas de la inflamación, como es el caso de la arteriosclerosis, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer. Por otro lado, el campo de los antiinflamatorios es, desde hace muchos años, un importante foco de atención en la investigación farmacológica. Los gastos sanitarios que se producen con la terapéutica antiinflamatoria alcanzan cotas extraordinarias. En el Mundo se consume al año más de 40.000 toneladas de aspirina y, por otro lado, no podemos olvidar que la gastropatía hemorrágica causada por cierto tipo de antiinflamatorios, en ocasiones fatal, es la más frecuente de las hemorragias de las vías digestivas altas.

Por todo esto decidí que este DISCURSO llevase por título el de FARMACOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN.

Parte del Discurso lo dedico al estudio de las bases patogenéticas y fisiopatológicas de la inflamación, porque sin el conocimiento de éstas es imposible proyectarse a lo que constituye la otra parte del Discurso, la terapéutica. En esta segunda parte he intentado, no sé si lo he conseguido, trazar una panorámica representativa del momento actual de la terapia antiinflamatoria y dibujar los caminos en donde creo está y por donde irá la TERAPÉUTICA ANTIINFLAMATORIA DEL FUTURO.

## LA INFLAMACIÓN (1)

La inflamación es un proceso agudo y/o crónico que constituye el sustrato fisiopatológico y morfológico de un gran número de las alteraciones que se producen en los seres vivos. La inflamación, en un sentido «teleológico» no es más que el mecanismo defensivo del organismo frente a cualquier tipo de agresión.

Se sabe desde hace años que en la inflamación, sea cual sea el mecanismo que la determina, se produce un proceso de fenestración de las paredes de los vasos capilares con salida de plasma y elementos celulares del interior del torrente circulatorio y posterior penetración en el espacio intersticial. Los leucocitos emigran hacia la zona inflamada. Bajo el punto de vista macroscópico este proceso representado por el eritema, el edema, el dolor, la hiperalgesia y el tumor son los signos cardinales de Celso: RUBOR, CALOR, TUMOR, DOLOR.

Es curioso e interesante señalar que Metchnikoff con certera visión, señaló en el año 1903, que la inflamación es un proceso defensivo del organismo en el que intervienen células fagocíticas procedentes de la sangre, siendo la diapedesis, la fagocitosis y la destrucción intracelular de los microorganismos, y del material fagocitado, junto con acúmulo plasmático, las fases señaladas por él como de la inflamación. Estos componentes, junto al incremento del flujo sanguíneo, vasodilatación, fueron considerados responsables del rubor, calor, dolor y tumor, signos y síntomas clínicos cardinales de la inflamación. La certera visión de Metchnikoff sigue siendo válida en el momento actual. Desde hace años los investigadores en este campo se han preguntado ¿por qué se produce esto?, ¿por qué

hay acúmulo y aumento de vascularización y acúmulo leucocitario?, ¿por qué hay aumento de la permeabilidad? ¿Cuáles son realmente las células que intervienen en la inflamación y cómo intervienen?

Desde hace años se ha ido sabiendo que todos estos hechos patológicos están desencadenados por la producción en el foco inflamatorio de una serie de sustancias, con una gran variedad de actividades biológicas responsables de estos hechos patológicos. La investigación en el campo de la inflamación ha permitido caracterizar un gran número de moléculas activas y responsables del desencadenamiento de la misma, así como conocer las células que directamente elaboran o producen estas sustancias. En una panorámica general hay que señalar que la inflamación interviene en el sistema defensivo tanto inespecífico como específico, por esto guarda una estrecha relación con la inmunidad. Podemos decir que la respuesta inmunitaria conduce a la reacción inflamatoria. Es por esto por lo que el sistema inmune juega un papel muy importante en el inicio y sobretodo en el mantenimiento de la inflamación. Las células de la inmunidad, en especial los linfocitos, tienen un papel trascendental en ello, de tal manera que los linfocitos, y dentro del grupo de los mismos los linfocitos T, que son los que inician la respuesta inmunitaria, juegan un papel importante y trascendental en los mecanismos de defensa y concretamente en el desencadenamiento de la inflamación.

El conocimiento de estas células y de estas moléculas ha sido y es fundamental para sustentar una farmacología de la inflamación. Se señaló, hace ya más de treinta años, que en esta zona inflamada aparecían «mediadores químicos». Son muchas las moléculas que se consideran, con mayor o menor actividad, que intervienen en la inflamación: Histamina, 5-hidroxitriptamina, bradiquinina. Sustancias de Reacción Lenta de la anafilaxis —SRS-A—, anafilatoxinas, factores quimiotácticos, prostaglandinas, tromboxanos, PAF, leucotrienos. La importancia y trascendencia de las mismas es muy diferente. En los últimos años el Factor de Activación de las Plaquetas —PAF—, las prostaglandinas y los leucotrienos han sido considerados como las moléculas más activas en la inflamación. Además las células fagocíticas emigran al foco inflamatorio, rompen las membranas de los lisosomas y liberan sus actividades proteolíticas al tejido.

## LAS CÉLULAS (2)

### LOS LINFOCITOS

Dentro del grupo de células que intervienen en la respuesta inmune, unas son directamente responsables de la iniciación de la misma, y otras son las encargadas de su regulación. Los linfocitos T, en especial un grupo de ellos, ponen en marcha la respuesta inmune por lo que podemos considerarles como responsables de la inflamación.

Los linfocitos T, así llamados porque son procesados en el timo después de originarse en la médula hematopoyética, sufren una serie de pasos madurativos al tiempo que van adquiriendo receptores para realizar adecuadamente su función. Los linfocitos T provienen de la célula pluripotencial de la médula y después de salir de las zonas o santuarios, donde se encuentran ubicadas las células pluripotentes, siguen la línea de diferenciación linfocitaria. Les aparece el receptor para el antígeno —TCR— que es la molécula caracterizada como CD3. Este receptor lo tienen todos los linfocitos y, en el 95% de los mismos, está constituido por dos cadenas, alfa — $\alpha$ — y beta — $\beta$ —. En el 5% restante de los linfocitos T, el receptor está constituido por tres cadenas, la alfa, la delta y la gamma ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ ).

Los linfocitos T que poseen la estructura molecular alfa-beta en su receptor, durante su maduración adquieren otras dos moléculas en su membrana, la CD4 y la CD8. De éstas dos moléculas, durante la maduración, del linfocito, desaparecerá una de ellas para seguir el linfocito la línea CD4 o la línea CD8. El 5% de los timocitos, portadores en la estructura molecular de su receptor las cadenas gamma-delta ( $\gamma$ - $\delta$ ), solamente expresan en un porcentaje muy pequeño de ellos la molécula CD8, nunca la CD4 y muchos no expresan ni la CD4 ni la CD8 en sangre periférica. La relación entre los linfocitos T CD4 y CD8 es de 2/1 (1).

En sangre periférica los linfocitos representan del 10 al 40% de los leucocitos, o de las células llamadas «blancas». De ellos el 80-70% son linfocitos T, el resto son filogenéticamente procesados en la Bolsa de Fabricio, por lo que se les llama linfocitos B. No pasa lo mismo en los órganos linfoides secundarios, ganglios linfáticos y bazo, ya que la mayoría de los linfocitos son linfocitos B.

La auténtica diferenciación entre los linfocitos CD4 y CD8 se debe al tipo de reconocimiento antigénico que realizan. Los CD4 reconocen al antígeno cuando éste les es presentado junto con las moléculas del complejo de histocompatibilidad HLA de la clase II. Los linfocitos CD8 reconocen a los antígenos cuando les son presentados por la molécula de histocompatibilidad HLA de la clase I. Esta específica diferencia entre las dos poblaciones de linfocitos T, los CD4 y los CD8, tiene gran importancia, ya que no todas las células del organismo disponen de moléculas de histocompatibilidad de la clase I y de la clase II.

Las moléculas HLA de la clase I se encuentran en todas las células nucleadas del organismo y son las encargadas de presentar antígenos producidos por la propia célula. Esto permite el reconocimiento inicial de las células propias del organismo, es decir las que tienen que ser toleradas por el sistema inmune. Estas moléculas propias de la célula, propias de la especificidad individual, son reconocidas, previa inspección, por los linfocitos CD8. Cuando en las células aparecen antígenos, que son péptidos, diferentes, extraños o anormales, como pueden ser los tumorales, los virales, etc. el linfocito T CD8 se encarga de destruir a este antígeno, destruyendo la célula tumoral o la célula infectada. Esto ha hecho, que por esta función los linfocitos CD8 sean considerados como una población citotóxica.

Frente a las moléculas de clase I, las moléculas de histocompatibilidad —HLA— de clase II, solo se encuentran en las células que participan directamente en la respuesta inmune, como son los linfocitos B y los macrófagos-monocitos. Su función es la de presentar a los linfocitos T CD4, antígenos extraños que provienen del exterior de la misma y que han penetrado en ella a través de un fenómeno de endocitosis. Los linfocitos T CD4 inspeccionan y reconocen a estos antígenos extraños, poniendo en marcha la síntesis de moléculas, llamadas «citoquinas», capaces de estimular la proliferación de las propias células linfáticas, de los macrófagos y de todas las células que intervienen en la respuesta inmune y en la inflamación, es decir a los linfocitos B, encargados de producir anticuerpos, así como a los linfocitos T en sus diversas poblaciones, a los macrófagos, a los neutrófilos, a los eosinófilos, a los basófilos. Esta capacidad activadora y proliferativa de la respuesta hace que a los linfocitos T CD4

se les denomine linfocitos cooperadores. A diferencia de las células CD8 no actúan con una respuesta citotóxica directa.

Durante la respuesta inmune los linfocitos T-CD4 se van a distribuir en grupos seleccionados para cumplir una función determinada. Así unos serán responsables fundamentalmente de la activación de la respuesta inmune de base humoral mientras que otros serán responsables de la respuesta de base celular. Esta diferenciación, hacia un tipo funcional u otro, se debe a la presión del ambiente en el que se encuentren.

Activados los linfocitos CD4 producen las citoquinas IL4, IL5, IL10, IL-13, que intervienen en la respuesta humoral, y también IL-2 y gamma interferían  $IFN\gamma$  propios de la respuesta celular (1). Estos linfocitos son los TH0. En una fase posterior estos linfocitos TH0 se separan en dos grupos, uno de ellos produce IL2 e Interferón gamma — $IFN\gamma$ — que estimulan la inmunidad de base celular, son los linfocitos TH1. El otro grupo sintetiza a las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 de la respuesta humoral, son los llamados TH2.

La respuesta inflamatoria desencadenada por la activación de los linfocitos CD4, está fundamentalmente sustentada por diversas actividades dependiendo de la subpoblación de linfocitos CD4 que se produzcan. Cuando sean los linfocitos TH2, es decir los responsables fundamentales de respuesta humoral, el complemento juega un papel importante ya que las inmunoglobulinas o anticuerpos que se producen la IgG y la IgM activan el complemento con participación secundaria de los mononucleares-macrófagos. Cuando los anticuerpos o inmunoglobulinas que se producen son del tipo IgE participan en la respuesta inflamatoria los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos.

A título de ejemplo señalaré que la reacción inflamatoria en el asma se debe en gran medida a la activación de los linfocitos T que elaboran citoquinas proinflamatorias. Los linfocitos CD-4 de enfermos asmáticos en sangre periférica muestran un incremento de expresión de sus marcadores. El número de linfocitos T activados guarda paralelismo con la eosinofilia periférica. En las biopsias bronquiales los linfocitos muestran marcas de activación, como la presencia de receptores de IL-2 que es lo que recibe el nombre de CD-25. En el líquido del lavado broncoalveolar hay elevación de los

linfocitos CD-25. Los linfocitos TH1 producen IL-2 e interferón gamma pero no IL-4 ni 5. Los linfocitos TH2 producen IL-4 y 5, pero no IL-2 ni gamma interferón. Tanto unos como otros producen IL-3 y el Factor de Crecimiento de los Macrófagos-Monocitos, GM-CSF.

Los linfocitos TH1 son los encargados de estimular la hipersensibilidad retardada, mientras que los TH2 son los encargados de estimular a los linfocitos B con producción de las inmunoglobulinas. El interferón gamma procedente del TH1 inhibe la proliferación de los clones de TH2. TH2 produce IL-10 e inhibe la producción de las citoquinas por los linfocitos TH1.

Todo esto es importante porque dependiendo del patrón celular que se estimule, el patrón o la cascada de citoquinas también varía y por tanto el panorama de expresión clínica, en este caso inflamatoria, varía de unas situaciones a otras.

El patrón encontrado de mRNA en los linfocitos de los lavados broncoalveolares de los enfermos asmáticos es el correspondiente al de las citoquinas TH2, por lo tanto esto subraya más la tesis de que TH2 interviene precisamente en el asma atópico. Es decir que podemos afirmar que en el asma atópico hay una activación de los genes de la IL-3, IL-4, IL-5 de la GM-CSF que es el patrón propio de la activación de los linfocitos TH2.

## MONONUCLEAR FAGOCÍTICO

Los macrófagos, y los monocitos tisulares, al ser activados por cualquier estímulo proinflamatorio desarrollan su capacidad fagocítica y de presentación de antígenos a los linfocitos, desarrollan su poder de citotoxicidad y, especialmente, producen gran número de moléculas inflamatorias, las citoquinas, unas reguladoras de la activación de los linfocitos y otros con capacidad directamente inflamatoria (tabla I).

Los monocitos macrófagos tienen en su membrana moléculas de histocompatibilidad de la clase 2, representadas por la HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. El antígeno, el microorganismo o el resto celular fagocitado, es fragmentado por acción proteolítica a varias moléculas de polipéptidos, en los cuales el polipéptido antigénico espe-



TABLA I

*Células pertenecientes al sistema mononuclear fagocítico*

---

**Médula ósea**

- Monoblastos
- Promonocitos
- Monocitos

**Sangre**

- Monocitos

**Tejidos** (Los macrófagos están entre los siguientes)

- Tejido conectivo (histiocitos)
- Piel (histiocitos, células de Langerhans?)
- Hígado (células de Kupffer)
- Bazo (macrófagos de la pulpa roja)
- Ganglios linfáticos (macrófagos libres y fijos)
- Timo
- Médula ósea (macrófagos residentes)
- Hueso (osteoclastos)
- Sinovial (célula tipo A)
- Pulmón (macrófagos alveolares y del tejido)
- Sistema linfático asociado a mucosas (MALT)
- Tracto gastrointestinal
- Tracto genitourinario
- Órganos endocrinos
- Sistema nervioso central (macrófagos, microglia, macrófagos del líquido cefalorraquídeo).

**Cavidades corporales**

- Macrófagos pleurales
- Macrófagos peritoneales

**Inflamación**

- Macrófagos del exudado
  - Células epiteliales
  - Células gigantes multinucleadas
-

cífico, de ese microorganismo o de la célula tumoral, se introduce o se incorpora en una zona de la hendidura que tiene la molécula HLA y así emigra a la superficie de la célula para ser presentado a los linfocitos CD4 que entrando en contacto con este complejo molecular lo reconocerá o no como propio. Si este linfocito CD4 tiene en su estructura el elemento estructural complementario al conjunto HLA-péptido o antígeno o fracción del antígeno, el linfocito CD4 se activará produciendo citoquinas.

Los macrófagos, y los monocitos tisulares, al ser activados por cualquier estímulo proinflamatorio desarrollan su capacidad fagocítica y de presentación de antígenos a los linfocitos, desarrollan su poder de citotoxicidad y, especialmente, producen gran número de moléculas inflamatorias, las citoquinas, unas reguladoras de la activación de los linfocitos y otras con capacidad directamente inflamatoria.

Los macrófagos y monocitos proceden de la médula hematopoyética, de la célula multipotencial estimuladas en su producción por los Factores Estimuladores de Colonias, los GM-CSF y más selectivamente el M-CSF, haciéndolas pasar de monoblasto a promonocito y finalmente monocito. Desde el torrente circulatorio pasan, a través de la célula endotelial, al seno de los tejidos, donde van a perdurar durante mucho tiempo, más que los dos o tres días que son capaces de perdurar en el interior del torrente circulatorio. En los tejidos tienen un gran poder de adaptación y desarrollan una misión importante de defensa y activación de la inflamación.

La primera fase, para que el monocito pase de la sangre a los tejidos, se realiza gracias a la presencia de moléculas de adhesión, tanto por parte del monocito como por parte de la célula endotelial.

La activación del monocito equivale a aumento de su actividad citotóxica debido todo esto a la presencia de citoquinas estimuladoras. El Interferón gamma —IFN- $\gamma$ —, producido por los linfocitos activados, la Interleucina 2, también producida por el linfocito T, activan al macrófago que produce el Factor de Necrosis Tumoral —TNF $\alpha$ — que actuando sobre el propio macrófago, de manera autocrina, produce una nueva oleada de activación. Por su parte los lipopolisacáridos de las membranas bacterianas, endotoxinas, también lo activan con producción de TNF- $\alpha$  (2).

La activación del macrófago incrementa su afinidad por el NADPH con la consiguiente fijación del oxígeno molecular y formación de superóxido molecular, que pasa a peróxido de hidrógeno y a otros radicales oxidativos, que juegan un papel muy importante en la inflamación y en la destrucción de células y microorganismos por parte del macrófago.

Las principales células citotóxicas que participan en la inflamación están representadas por los macrófagos, los neutrófilos, los linfocitos T citotóxicos y las células citotóxicas naturales —NK—. Estas derivan de los linfocitos, son realmente linfocitos modificados, tienen un tamaño mayor, un protoplasma granular y por eso son denominados «linfocitos grandes». Su capacidad citotóxica la expresan fundamentalmente frente a las células infectadas por virus y a las células tumorales. Tienen además una gran capacidad para producir citoquinas. Las células NK son activadas por la IL-2. Una vez activadas representan las células Lac o células citotóxicas activadas por linfocitos. Las células natural killer —NK—, células citotóxicas naturales, responden muy bien a los estímulos del Factor de Necrosis Tumoral —TNF- $\alpha$ — y al IFN- $\gamma$ . Estas células citotóxicas naturales son capaces de activar al macrófago incorporándolo, por así decirlo, a la respuesta inmune de lucha, de citotoxicidad y de inflamación.

## NEUTRÓFILO

Los neutrófilos son los elementos celulares fundamentales de la respuesta inflamatoria. Los neutrófilos se forman en la médula hematopoyética, proceden de un tronco común y son estimulados por factores de crecimiento, inicialmente no específicos y cuando su grado de maduración es más específico por la acción del Factor de Crecimiento Granulocítico.

En el proceso inflamatorio los neutrófilos son atraídos al foco de reacción y allí son activados, estimulados, por un sin número de sustancias, siendo especialmente responsables la IL-8, las quimocinas, el fragmento 5 del complemento —C5a— y el leucotrieno B<sub>4</sub>.

Los leucocitos circulantes tienen que llegar al foco de inflamación saliendo de los vasos a través de la pared y concretamente de

la célula endotelial. Existe un fenómeno primero de adhesión del leucocito a la pared endotelial y después de penetración. Esta acción de adhesión del leucocito a la célula endotelial se realiza por la existencia de moléculas o receptores de carácter glicoproteico, tanto en el leucocito como en la célula endotelial.

Las selectinas son los representantes de las moléculas de adhesión y aparecen, tanto en los polinucleares neutrófilos como en las células endoteliales, como consecuencia de la acción de activadores representados fundamentalmente por las endotoxinas bacterianas.

Las selectinas son glicoproteínas que tienen la peculiaridad de, expresadas sobre las membranas, unirse a carbohidratos. La selectina-E es la propia de las células endoteliales y tiene un ligando característico que es el carbohidrato sialil-Lewis X, que se encuentra fundamentalmente en los monocitos y en los neutrófilos. La unión de los granulocitos a estos receptores origina un enlentecimiento de los mismos y una marginación y fijación cada vez mayor sobre la célula endotelial. Por su parte, en los leucocitos aparece la selectina-L que favorece aún más la fijación definitiva del polinuclear sobre la célula endotelial, con el contacto fijo del polinuclear en la superficie endotelial, y así poder entrar en contacto con los activadores, sustancias producidas en el foco inflamatorio.

Una vez que los neutrófilos se han fijado sobre la célula endotelial, ponen en marcha la expresión de las integrinas, que son glicoproteínas compuestas de dos cadenas alfa y beta. La cadena alfa es diferente para cada una de las tres, lo que origina los tres tipos de glicoproteínas la CD11a, CD11b y CD11c. Por su parte, la cadena beta es común para todas ellas y recibe el nombre de CD18. De tal manera que las integrinas son complejos que se expresan por la denominación CD11/CD18 y son específicas de las células leucocitarias. Tanto en la célula en reposo como en la célula activada se encuentran las tres integrinas, si bien las integrinas CD11b y CD11c son más intensas en los leucocitos activados.

Lo interesante es que estas integrinas se unen a receptores glicoproteicos de la superficie de las células endoteliales que son el ICAM-1 o molécula de adhesión intercelular 1 o CD54 y también a la otra glicoproteína que es la ICAM-2. Esta fijación de las integrinas defi-

nitivamente a las glicoproteínas de la célula endotelial hace que el polinuclear quede definitivamente fijo sobre la misma.

Las integrinas también permiten la unión de unos polinucleares con otros, ya que las células polinucleares también expresan en su superficie las moléculas de adhesión ICAM-1. Esta agrupación polinuclear es muy eficaz funcionalmente con verdaderos aglomerados de polinucleares. Después de la fijación definitiva del polinuclear sobre la célula endotelial, se produce la fase de emigración y penetración a través de la pared de la célula endotelial.

Los linfocitos también tienen este tipo de moléculas de adhesión.

La transcendencia de las moléculas de adhesión entre la célula polinuclear y la célula endotelial es muy importante en la lucha frente a las infecciones, la prueba es que hay casos en los que existe una alteración genética, concretamente del gen de la cadena beta de las integrinas, que hace que estas no se expresen adecuadamente y en cantidad sobre la superficie del neutrófilo, lo que condiciona que estos enfermos tengan tendencia a las infecciones y tengan un dato característico que es la ausencia de la presencia de pus.

Después de la penetración a través de la célula endotelial, el granulocito se dirige al foco inflamatorio por la presencia de sustancias quimiotácticas. Tienen actividad quimiotáctica el leucotrieno B<sub>2</sub>, la fracción 5 del complemento, la interleucina IL-8, además de otras muchas sustancias. El poder de migración de los leucocitos hacia la presencia de bacterias o de péptidos quimiotácticos está mediada, al parecer, por la existencia de una metaloproteasa, que es una endopeptidasa neutra, lo que recibe el nombre de NEP.24.11. La expresión de esta metaloproteasa, investigada por citometría de flujo en enfermos con colitis ulcerosa, se ha demostrado que se encuentra especialmente reducida y la acción de esta metaloproteasa es dificultar la quimiotaxis, lo que indica que en estos enfermos la quimiotaxis está favorecida por la carencia o reducción en la cuantía de este péptido endopeptidasa.

Después viene la fagocitosis que se realiza gracias a la presencia de receptores en la membrana leucocitaria, exactamente igual que lo tienen los monocitos.

Los granulocitos tienen los gránulos azurófilos también llamados primarios. Estos gránulos constan de varias sustancias, siendo el componente importante la mieloperoxidasa. Su misión fundamental es la de unirse a los fagosomas y así destruir a las microbacterias, a las bacterias o microorganismos que han sido fagocitados. Su ausencia produce tendencia a las infecciones, especialmente a las candidiasis en los individuos diabéticos, ya que en los individuos normales esta tendencia queda muy reducida.

Además de los gránulos primarios se encuentran los gránulos secundarios que tienen en su composición sustancias microbicidas y en especial lisozima. Estos gránulos son los que almacenan en su interior a las integrinas CD11b/CD18 y CD11c/CD18.

Con la liberación, por activación del leucocito, de los gránulos secundarios, expulsa gran cantidad de sustancias con poder quimio-táctico, con lo cual se aumenta la cantidad de granulocitos en el foco inflamatorio. A su vez, los gránulos secundarios eliminan sustancias que activan el complemento, lo cual produce liberación, producción más bien, de factores quimiotácticos como el C5a y además de opsoninas que favorecen la fagocitosis.

Al producirse la activación del leucocito se realiza una explosión oxidativa al activarse la oxidasa NADPH, con formación del anión superóxido que pasa posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de superóxido dismutasa. El poder destructor de los radicales libres es muy importante y cuando está alterada su formación los enfermos tienen marcada tendencia a la infección, siendo esto lo propio de la enfermedad granulomatosa crónica.

Los productos o sustancias liberadas por el leucocito activado, muchas tienen capacidad destructiva sobre los tejidos por su capacidad proteolítica, además juegan papel potenciador de la broncoconstricción frente a sustancias con capacidad de estimulación de la contracción de los músculos bronquiales y agravan también la situación clínica del distress respiratorio del adulto. Se ha señalado la importancia grande que tienen los polinucleares en la evolución y producción del enfisema, situación en la que se destruyen las paredes alveolares con destrucción de las fibras elásticas, por la liberación de elastasa.

Las enzimas proteolíticas juegan un papel capital en la destrucción de la articulación en los procesos inflamatorios, tanto agudos como crónicos y tienen también importancia en el llamado síndrome de la reperusión.

## BASÓFILOS Y MASTOCITOS

Son células que juegan un importante papel en todas las inflamaciones con expresión clínica alérgica. Estas células tienen un papel preponderante en la inflamación y muy especialmente en aquellas respuestas inflamatorias en las que interviene la inmunoglobulina IgE. Tienen receptores de gran afinidad para la inmunoglobulina IgE. Tanto los basófilos como los mastocitos tienen un importante número de gránulos basófilos, de ahí el nombre que reciben, que al ser eliminados, tras su activación, producen las manifestaciones inflamatorias características. Los factores de activación y de crecimiento de las células basófilas son la interleucina IL-3, la GM-CSF y la IL-5.

Cada célula basófila contiene en su superficie de  $10^5$  al  $6^6$  moléculas de IgE. Cuando estas entran en contacto con el antígeno específico, en este caso alergeno y se forma un puente entre dos moléculas o más de receptores IgE, se activa y se produce la movilización de los gránulos del interior.

Pueden activar a estas células y liberar los contenidos de los gránulos, la fracción C5a del complemento, péptidos bacterianos, agentes químicos, agentes físicos, neuropéptidos y citoquinas.

La lista de moléculas activas que liberan los basófilos y los mastocitos es muy grande. Se consideran como sustancias ya preformadas y presentes en los gránulos los proteoglicanos, la heparina, la histamina, la carboxipeptidasa, la serinproteinasas y las sulfatasas. Muy importante es que por acción oxidativa en el momento de la activación del ácido araquidónico se produce por la vía de la ciclooxigenasa la prostaglandina D2 —PGD2—, así como por la vía de las lipooxigenasas la formación de leucotrienos. De los leucotrienos el inicialmente formado es el LTC<sub>4</sub>, pero pasa posteriormente a LTD<sub>4</sub> y a LTE<sub>4</sub>. Además liberan PAF.

Se ha señalado una especificidad territorial de los mastocitos, en el sentido de que en determinadas zonas del organismo, éstos solamente son capaces de producir un determinado tipo de metabolito derivado del ácido araquidónico. Los mastocitos de la piel producen fundamentalmente PGD<sub>2</sub>, mientras que los mastocitos del aparato digestivo y del aparato respiratorio producen cantidades similares de prostaglandinas y de leucotrienos, es decir de DPG<sub>2</sub> y de LTC<sub>4</sub>. Los basófilos, es decir las células en sangre periférica, producen en su activación leucotrienos, pero no prostaglandinas. Ya indico aquí que la PGD<sub>2</sub> produce adherencia de los leucocitos a las células endoteliales, produce aumento de la permeabilidad de las vénulas, inhibe la agregación plaquetaria, atrapa por poder quimiotáctico positivo los neutrófilos, produce vasodilatación periférica y broncoconstricción. Los leucotrienos producen broncoconstricción mantenida con secreción de moco y aumento de permeabilidad de las vénulas. El LTC<sub>4</sub> es además quimiotáctico positivo para los neutrófilos.

También, tras la activación de los mastocitos por activación del ácido araquidónico, se produce el PAF o Factor Activador de las Plaquetas, que lo generan los mastocitos tisulares pero no los basófilos en el torrente circulatorio. Esta sustancia es gran activadora de las plaquetas produciendo su activación y liberación de sus gránulos, pero es responsable también de un aumento de la reactividad del árbol bronquial produciendo asma, especialmente en los individuos predispuestos a ello.

Por otro lado, en los últimos años se ha señalado que la activación de los mastocitos produce una cascada de citoquinas que intervienen muy activamente en la inflamación, por un lado las citoquinas que producen regulan la producción de IgE, como son la IL4 y el IFN- $\gamma$ . La cascada de citoquinas es responsable de la puesta en marcha del proceso inflamatorio, sobrepasando lo que es simplemente la respuesta anafiláctica o respuesta alérgica tipo I y desencadenar una inflamación de carácter crónico.

## EOSINÓFILOS

Los leucocitos eosinófilos, llamados así por tener gránulos que se tiñen de rojo por la eosina, tienen un papel muy importante en la



respuesta inflamatoria y muy en especial en la anafilaxis. Son estimulados desde las células progenitoras por la interleucina 3, IL-3, por la GM-CSF y especialmente de una manera específica por la interleucina 5, que además es capaz de activarlos y de hacer que se localicen en lugar de la inflamación. Por esto los eosinófilos tienen en su superficie receptores específicos para la IL-5.

Los eosinófilos se encuentran fundamentalmente localizados en el tejido conjuntivo de la piel, de las mucosas, siendo especialmente atraídos por la fracción 5 del complemento, C5a, el factor activador de las plaquetas, PAF, la IL-2, IL-8 y la quimioquina Rantes, que es una sustancia quimiotáctica específica para los granulocitos eosinófilos.

La respuesta de los eosinófilos a las sustancias antes señaladas se potencia cuando han sido previamente activados de una manera intensa por la IL5 y menos por la GM-CSF.

Los eosinófilos pasan la pared vascular al igual que los leucocitos granulocitos o neutrófilos, adheriéndose primero con las mismas moléculas de adhesión, además el eosinófilo tiene una molécula de adhesión específica que es la VLA-4 que no la tienen los neutrófilos y que se une al receptor de la célula endotelial el VCAM-1, que es una molécula de adhesión de las células endoteliales.

Los eosinófilos tienen gran poder de lesión en la inflamación.

En los mamíferos la infección por helmintos produce elevación de los eosinófilos en la sangre y en los tejidos, elevación de la inmunoglobulina IgE y mastocitosis en la mucosa intestinal. Se sabe que esta respuesta está regulada por los linfocitos T, ya que en los animales atímicos esto no se da.

La IL-5 estimula la formación de colonias de eosinófilos y su maduración, lo que indica que la infestación por parásitos —helmintos— estimula la formación de IL-5. Esta acción de la IL-5 es selectiva para los eosinófilos mientras que no lo es la acción de la IL-3 ni la del GM-CSF, pese a que tanto la una como el otro estimulan la formación de los eosinófilos *in vitro*. La regulación de la IL-5 y por tanto la eosinofilia y la hiperglobulinemia IgE se debe a citoquinas producidas por los linfocitos Th2 del tipo CD4. Es la IL-4 el factor determinante del incremento de la IgE y de la IL-5. La supresión de la IL-5 suprime también la respuesta eosinofílica, por esto se

busca la utilización de moléculas que inhiban la síntesis de IL-5 para el tratamiento de las situaciones hipereosinofílicas tipo asma, eosinofilia tropical o síndrome hipereosinofílico (3).

La utilización de anticuerpos monoclonales antiinterleucina-5 antiIL-5, inhibe la formación de colonias de eosinófilos estimulados por IL-5, por el contrario esta inhibición no se produce cuando las colonias están estimuladas por IL-3 o por el Factor de Crecimiento Macrófago Granulocito el GM-CSF.

Los glucocorticoides ejercen una acción opuesta a la IL-5 sobre la supervivencia o viabilidad de los eosinófilos. Como se sabe la IL-5 estimula a los eosinófilos y además alarga su viabilidad, al igual que lo hacen la IL-3, el GM-CSF y el IFN $\gamma$ . La acción opuesta que producen los glucocorticoides es dosis dependiente. Hay eosinopenia y reducción de la infiltración eosinófila. Este efecto negativo sobre los eosinófilos es mayor con el empleo de la dexametasona y menor con el empleo de la hidrocortison, teniendo la metilprednisona un efecto intermedio (4).

## LAS MOLÉCULAS DE LA INFLAMACIÓN

### HISTAMINA

Las células productoras de histamina se encuentran situadas fundamentalmente en el territorio perivascular. La histamina, que deriva del aminoácido histidina, interviene en la regulación del tono vasomotor y produce vasodilatación y edema al actuar sobre los receptores H1 de las células endoteliales (5) poniendo en marcha la producción de prostaciclina —PGI<sub>2</sub>— así como de la Sustancia Vasodilatadora Vascular —NO—. La histamina produce contracción de la célula endotelial con la consiguiente formación de espacios entre las mismas, del tamaño de una micra, lo que favorecen la extravasación de plasma. Este proceso se realiza por activación de la actina, ya que la inhibición de su polimerización bloquea la aparición de este fenómeno. Concentraciones elevadas de histamina en plasma producen una situación similar a la que aparece en la crisis anafiláctica con reducción de la presión arterial, eritema e hipermotilidad gastrointestinal (6).

La histamina es responsable del incremento de la permeabilidad vascular en la urticaria, en la anafilaxis, en el asma, en la rinitis, así como también de la broncoconstricción en el asma y del prurito en la urticaria. La histamina aumenta la secreción de moco en la rinitis y en el asma, siendo responsable en gran medida del shock. En el líquido del lavado broncoalveolar, tras la estimulación con alérgenos, hay histamina producida por las células cebadas estimuladas por moléculas proinflamatorias como la PGD<sub>2</sub>, el tromboxano A<sub>2</sub> y leucotrienos.

En los últimos años, por la aparición de otros factores proinflamatorios más poderosos, se ha ido minimizando el papel de la histamina en la inflamación. Este hecho no debe quitar importancia a la intervención de la histamina en la inflamación, en especial en algunas respuestas inflamatorias.

## ANAFILATOXINAS

Las anafilatoxinas son péptidos de bajo peso molecular con gran actividad biológica. Actúan sobre las paredes de los pequeños vasos, sobre los músculos lisos, sobre las células cebadas, sobre los fibroblastos y fundamentalmente sobre los leucocitos y macrófagos-monocitos. Guardan una estrecha relación con el Sistema del Complemento, originándose por la acción enzimática sobre algunos fragmentos del mismo, como son el C3, C4, C5. Las moléculas que secundariamente se producen, son el C3a, el C4a y el C5a. El C3a y el C4a son péptidos puros y el C5a es un glicopéptido. Todas tienen gran similitud en la composición de sus aminoácidos. Tienen especificidad de especie y de tejido. El C5a incrementa la permeabilidad vascular entre 200 y 3000 veces más que el C3a y el C4a.

Para desarrollar plenamente la actividad anafiláctica estos polipéptidos requieren la integridad de la porción carboxi-terminal. Se trata de un pentapéptido, que para el C3a es la leucina-glicina-leucina-alanina-arginina (7), para el C4a el pentapéptido está constituido por la alanina-glicina-leucina-glutamina-arginina. La eliminación de la arginina terminal reduce la actividad de las dos anafilatoxinas (8). Por su parte el C5a contiene cuatro moléculas de glucosamina, tres de ácido siálico, cuatro de manosa y dos de galactosa. Este complejo oligosacárido se encuentra unido a la asparragina en la

posición 64. Su capacidad funcional recae también en un pentapéptido carboxiterminal constituido por metionina-glicina-leucina-glicina-arginina. La sustracción de esta arginina reduce su actividad como anafilatoxina.

En el suero de una amplia serie de animales, como la rata, la cobaya, el cerdo, el perro, se puede demostrar la presencia de péptidos con actividad anafiláctica procedente del complemento. Esto, sin embargo, no es fácil demostrarlo en el hombre (9). Los estudios en este sentido han demostrado en el suero la presencia de una sustancia inhibidora de la anafilatoxina. Se trata de una carboxipeptidasa, globulina presente en el plasma y en el suero humano, que actúa con gran rapidez, liberando por hidrólisis la arginina terminal de los fragmentos C3a y C5a con su consiguiente inactivación. Este inactivador es termolábil y es a su vez inhibido por el ácido epsilon-aminocaproico. La adición al suero de este compuesto ha permitido demostrar la presencia de anafilatoxinas del complemento en el suero humano. La carboxipeptidasa inhibidora de las anafilatoxinas se ha identificado con la carboxipeptidasa-N del plasma.

La inyección subcutánea de C5a produce el típico habón histamínico. Los antihistamínicos son capaces de reducir su acción sobre los vasos. Parte de la acción biológica de estas anafilatoxinas se debe a la activación metabólica del ácido araquidónico. Las anafilatoxinas C3a y C5a liberan prostaglandinas y leucotrienos actuando sobre el tejido pulmonar y sobre los macrófagos. La utilización de antagonistas de los leucotrienos limita la acción de estas anafilatoxinas. Efecto inhibitor también ejerce la aspirina y la indometacina, que inhiben a la enzima ciclooxigenasa. El C5a, y también el C3a, activan las plaquetas.

## OPSONINAS

Oponina es un término derivado del griego que significa «preparar para la digestión». Fragmentos del complemento pueden actuar como opsonina.

El complejo enzimático C3 convertasa, hidroliza la cadena alfa del C3 entre los aminoácidos 77 y 78, produciendo un pequeño frag-

mento, el C3a y un fragmento mayor, el C3b, que se fija a superficies biológicas. Sobre este fragmento actúan dos serin proteasas, el factor H y factor I, dando origen a varios fragmentos, el C3bi, el C3dg y el C3d. Los fragmentos C3b, C3bi se fijan sobre la superficie de partículas bacterianas donde son reconocidos por los fagocitos al unirse a receptores específicos. Las fracciones C3b y C3bi son los responsables genuinos de la acción opsónica, tienen además el poder de estimular la generación de moléculas de oxígeno, así como la de liberar histamina.

## ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA

Los fragmentos del complemento C5, C6 y C7 tienen actividad quimiotáctica (10). De éstos, el que tiene mayor actividad es el C5. Actúan frente a los neutrófilos, eosinófilos, basófilos. Otra molécula con acción quimiotáctica específica para un tipo celular es la «proteína MCP-1», que atrae a los monocitos a zonas de inflamación como se ha señalado en la placa de ateroma, esclerosis múltiple y artritis reumatoide (11). La actividad quimiotáctica la realiza fijándose sobre receptores de unos 350 aminoácidos en la superficie del mononuclear, produciéndose una internalización del complejo y la movilización rápida del fagocito. Hay de 100.000 a 300.000 receptores por célula.

En el suero humano se ha caracterizado dos factores inactivadores quimiotácticos, uno es una alfa-globulina que inactiva al C5, el otro es una beta-globulina que inactiva moléculas quimiotácticas de origen bacteriano. El factor antiC5 es termolábil, destruyéndose a 56 grados durante 30 minutos. Este factor antiquimiotáctico se encuentra elevado en enfermos con sarcoidosis, con hepatitis alcohólica, en la cirrosis hepática, en la lepra lepromatosa y en la enfermedad de Hodgkin (12), lo que justifica que en estos casos exista un defecto en la movilización de las células inflamatorias. También en el Lupus Eritematoso Sistémico se ha encontrado una proteína, estable a 56 grados, que inhibe de manera reversible la actividad quimiotáctica de los derivados del C5. Los niveles de este inhibidor guardan relación con la susceptibilidad a las infecciones bacterianas (13).

## LAS QUININAS Y EL SISTEMA DE CONTACTO DE LA COAGULACIÓN

El Sistema de la Coagulación, que guarda estrecha relación con otros sistemas biológicos, puede tener un papel activo en la inflamación. El factor XII, también llamado Factor Hageman —FH— en honor del primer enfermo en el que Ratnoff describió el defecto, pertenece al grupo de los factores de la Fase de Contacto de la Coagulación. El Sistema de Contacto activa y es activado por «las quininas», por esto tiene importancia en la respuesta vasoactiva que aparece en la inflamación. La calicreína activa al FH.

La unión del Factor Hageman sobre las superficies electronegativas, células endoteliales, produce un cambio conformacional de su molécula que favorece la aposición y el estrecho contacto de las diferentes moléculas que intervienen en la fase de contacto. Este cambio espacial permite que mínimas cantidades de calicreína lo activen, con un potencial 500 veces mayor que si no estuviera fijado al endotelio.

El Factor Hageman activo —FH<sub>a</sub>—, activa al complemento a través de la vía clásica, interviniendo, de este modo, en la producción de moléculas proinflamatorias. Pero con independencia de su acción sobre el complemento el FH<sub>a</sub> tiene capacidad directa de incrementar la permeabilidad vascular con una potencia de 10 a 100 veces más que la propia bradiquinina (14).

El factor Hageman activa la precalicreína —PK— haciéndola pasar a calicreína. Esta, actuando sobre el «quininógeno de alto peso molecular», libera bradiquinina. Esta hidrólisis produce, además del nonapéptido bradiquinina, el Fragmento I-II rico en histidina. La bradiquinina es un potente vasodilatador y participa en la producción del edema. El Fragmento I-II rico en histidina, tiene actividad vasoactiva, incrementando la permeabilidad vascular pero con una potencia 100 veces menor que la producida por la bradiquinina.

La bradiquinina es inactivada por proteasas. La carboxipeptidasa —quininasa I— libera la arginina de la zona carboxi-terminal, generándose un péptido de ocho aminoácidos. Esta carboxipeptidasa-N tiene también la propiedad de inactivar las anafilatoxinas C3a, C4a, C5a. Otra proteinasa, la quininasa II, que

es una dipeptidasa, libera de la bradiquinina dos aminoácidos, la fenilalanina y la arginina, produciendo un septapéptido que posteriormente pasa a pentapéptido.

La bradiquinina tiene múltiples acciones biológicas uniéndose a receptores celulares. Las células endoteliales, los fibroblastos y otras células, tienen receptores específicos para la bradiquinina. La unión de la bradiquinina a su receptor favorece la formación de Fosfolipasa A2 con la consiguiente aparición de ácido araquidónico —AA— y sus metabolitos prostaglandinas, leucotrienos. La bradiquinina produce aumento de la permeabilidad vascular, contracción de los músculos lisos, reducción de la resistencia arterial con hipotensión secundaria, marginación de los leucocitos, incremento de la motilidad intestinal. La inyección subcutánea de bradiquinina desencadena la aparición de un habón, parecido al que produce la histamina, en el que no hay reflejo axónico, el eritema es menor pero es intensa la sensación de dolor y de quemazón mientras que el habón histamínico es pruriginoso.

Muchos ejemplos clínicos y experimentales avalan la participación del Sistema de Contacto y de las quininas en la inflamación. La inyección intraarticular de bradiquinina produce calor articular y dolor, pero escasa acumulación de leucocitos. Se ha demostrado la presencia de componentes del Sistema de Contacto en el líquido sinovial habiéndose señalado que en la Artritis Reumatoide se encuentran moléculas con cargas electronegativas, como el condroitin-sulfato y ciertos componentes del cartílago (15), que al igual que los microcristales pueden activar al sistema de contacto. Las células cebadas y las células basófilas liberan moléculas de carga electronegativa, como los glicosaminoglicanos y proteoglicanos, que aumentan el poder de activación de los factores de contacto. En el líquido sinovial de Artritis Reumatoide se encuentran niveles altos de quinina y bajos de quinínógeno de alto peso molecular —HMWK—. La inyección de microcristales en una articulación produce elevación importante de bradiquinina, al tiempo que aparecen los síntomas y signos de artritis aguda. Este efecto puede ser bloqueado mediante la infusión de carboxipeptidasa, que es el inactivador fisiológico de la bradiquinina.

Como ampliación al hecho real de las modificaciones de la coagulación sanguínea en la inflamación, señalaremos que la elevación

de IL-6 guarda paralelismo con la reducción de la Antitrombina III, proteína C antigénica y Factor Hageman, al tiempo que aumentan los valores de PAI-1 y complejo trombina-antitrombina (16).

La bradiquinina se considera un factor importante en la producción de la broncoconstricción que acompaña a las reacciones alérgicas. La aplicación de un aerosol de bradiquinina produce broncoespasmo en los enfermos asmáticos y no en los individuos normales. En las rinitis alérgicas y en las vasomotoras producidas por el frío, aire seco y rinovirus, la secreción nasal tiene un incremento importante de quininas. En los enfermos atópicos, el contacto con el alérgeno, produce incremento de quininas en la secreción nasal. Por otro lado en el líquido del lavado broncoalveolar de enfermos asmáticos está elevada la lisina-bradiquinina.

## LAS CITOQUINAS

### INTERLEUCINA-1

La interleucina-1 se produce fundamentalmente en los macrófagos activados. Desde su descripción inicial, como «pirógeno endógeno», ha despertado notable interés como mediador en múltiples situaciones patológicas así como en la producción de la respuesta inflamatoria aguda. La inyección de IL-1, a animales de experimentación, produce reacción febril, con neutrofilia, aumento de la IgG y de los reactantes de fase aguda (tabla II).

El nombre de interleucina 1 —IL-1— se aplica a dos polipéptidos —IL-1 $\alpha$  y IL-1 $\beta$ — que tienen un amplio espectro de acciones biológicas sobre la inflamación, el metabolismo, la hematopoyesis y la inmunidad. A pesar de que las dos formas de IL-1 derivan de genes distintos, (17) tienen los mismos receptores celulares y parecida actividad biológica. La producción de IL-1 aumenta de forma muy importante en diversas células como respuesta a la infección, toxinas, agentes inflamatorios, productos derivados de linfocitos activados, complemento y factores de la coagulación.

Las dos formas de IL-1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) corresponden a los dos tipos de pirógenos endógenos que se describieron con diferente punto iso-



eléctrico. La secuencia genómica de las dos moléculas es conocida y los dos se encuentran en el cromosoma 2.

TABLA II

*Propiedades proinflamatorias de la IL-1*

---

Fiebre, anorexia, somnolencia, hipotensión, shock
Liberación de neuropéptidos
Supresión de la síntesis de cit P-450
Estimula la formación de complemento
Activa a las células endoteliales
Neutrofilia
Aumentan las moléculas de adhesión
Degranulación de eosinófilos
Infiltración leucocitaria (IL-8)
Citotoxicidad islotes $\beta$ del páncreas
Aumenta el turn-over de aminoácidos
Hiperlipemia
Activa la expresión de los genes del complemento, COX-2 y lipooxi- genasa
Activa los osteoclastos y la síntesis de colagenasa

---

El receptor para la IL-1 es el mismo para las formas  $\alpha$  y  $\beta$  y no lo comparten con otro tipo de citocinas. Tanto la IL-1 $\alpha$  como  $\beta$  compiten por su unión a linfocitos T y a fibroblastos. En general la cuantía de receptores se correlaciona con la capacidad de respuesta celular a la IL-1, habiendo células que expresan un número bajo de receptores.

La administración sistémica de IL-1 a humanos, por vía intravenosa, produce, a dosis de 10 a 100 ng/kg, fiebre, somnolencia, anorexia, mialgias, artralgias generalizadas, alteraciones gastrointestinales e hipotensión (18).

La IL-1 estimula la función de una gran variedad de genes (tabla III). Algunos se expresan (19) mientras otros se estabilizan y prolongan la vida media del mRNA, como por ejemplo el factor estimulante de colonias granulocito/macrófago —GM-CSF—. La IL-1 también

favorece la expresión de albúmina y citocromo P450. El mecanismo por el cual la IL-1 estimula a algunos genes puede deberse a la activación de factores nucleares inducibles como el NFkB (20) y el AP-1.

TABLA III

*Inducción de la expresión de genes producida por la IL-1*


---

IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8  
 TNF  $\alpha$  y  $\beta$ . INF- $\beta$   
 GM-CSF, G-CSF, M-CSF  
 COX-2, COX-1. Fosfolipasa A2  
 Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
 Moléculas de adhesión  
 Oncogenes (c-fos, c-myc, c-jun)  
 PAI-1, activador del plaminógeno  
 Proendotelina  
 Factor liberador de corticotrofina  
 Proteína amiloide  
 Colagenasa

---

En el hígado la IL-1 estimula la síntesis de proteínas, especialmente de proteínas patológicas, como la proteína sérica del amiloide (SAA), implicada en el desarrollo de amiloidosis secundaria. También induce la síntesis de fibrinógeno, componentes del complemento y diversos factores de la coagulación. La interleucina-6 —IL-6— actúa como mediador en la síntesis de fibrinógeno. La IL-1 contribuye en los procesos inflamatorios a un balance nitrogenado negativo debido a su efecto anorexígeno, al actuar sobre el centro hipotalámico del apetito.

La IL-1 sobre las células endoteliales aumenta la expresión de moléculas de adhesión, lo que conduce al aumento de la adherencia de los leucocitos. Células endoteliales tratadas con IL-1, también aumentan la producción de actividad procoagulante, de PGE2, de PGI2, de PAF y del inhibidor del activador tisular del plasminógeno PAI-1. Además existe un aumento de síntesis de otras citoquinas, incluida la propia IL-1, y estimula la formación de células muscula-

res lisas, efecto que tiene importancia en el desarrollo de la aterosclerosis y la neovascularización.

Actúa sinérgicamente con los factores estimulantes de colonias hematopoyéticas y otras citoquinas en la hematopoyesis, regula el ciclo celular de las células progenitoras hematopoyéticas y las protege de agentes citotóxicos. Por sí misma la IL-1 no tiene efecto sobre la proliferación o diferenciación de la célula progenitora, sino que requiere de los factores de crecimiento de colonias y de IL-3. Tras la inyección de una dosis de IL-1 se produce un aumento de los granulocitos circulantes, pero a dosis elevadas induce granulocitopenia por aumento de la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales. También la IL-1 es un estimulante de la producción de plaquetas, efecto mediado por la acción sinérgica con la IL-3 (21).

En una regulación normal de las acciones de la IL-1 interviene el receptor de la misma, el IL-1Ra, del que existe un «pool» intracelular libre que fija a la IL-1 y evita un exceso de acción de la misma. Debe existir un adecuado equilibrio entre el IL-1Ra y la IL-1.

El receptor de la IL-1, el IL-1ra, es una molécula proteica de 22-25 kd, de estructura similar a la IL-1 $\alpha$  y a la IL-1 $\beta$ . Tiene la capacidad de unirse al receptor de la IL-1 impidiendo el acoplamiento sobre el mismo de la IL-1 $\alpha$  y de la IL-1 $\beta$ , bloqueando de este modo su activación. Podemos afirmar que este antagonista natural de la IL-1ra inutiliza a la propia IL-1 al impedir su unión y activación de su receptor. EN TÉRMINOS DE EQUILIBRIO FISIOLÓGICO ESTE ANTAGONISTA PUEDE SER CONSIDERADO COMO UN POTENTE ANTIINFLAMATORIO. Este antagonista tiene cuatro alelos que se combinan en proporción diferente según los individuos (22).

Sobre la piel los rayos ultravioletas producen un incremento de la IL-1 y del TNF $\alpha$ . La IL-1 a su vez estimula la formación del factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos —GM-CSF—, así como también de la IL-6 y de la IL-8. Este patrón de citoquinas tiende a la producción de inflamación local importante, pero en los individuos normales el exceso de IL-1 que se forma, procedente de los queratinocitos, es neutralizado por el pool intracelular de IL-1Ra, que se libera con la muerte celular. Se ha señalado una diferencia importante en los niveles de IL-1Ra. Aquellos individuos que tienen una buena producción del receptor de la IL-1 reducen la

inducción de la molécula de adhesión intercelular, la ICAM-1, en respuesta a la interleucina-1 exógena, mientras que los que tienen baja la producción de este receptor tienen una respuesta importante de esta molécula de adhesión. La fotosensibilidad estaría en función de un desequilibrio en la producción de citoquinas. Cuando en el locus del IL-1Ra existe el alelo IL-1RN\*2 se altera la producción de la proteína receptora IL-1Ra y esto justifica la fotosensibilidad como se ha demostrado en portadores de este alelo. Se ha señalado que los monocitos de enfermos con lupus eritematoso sistémico con fotosensibilidad producen bajos niveles de IL-1 inhibidores.(23).

La asociación del IL-1RN\*2 con ciertos procesos inflamatorios, dermatosis, colitis ulcerosa, diabetes, es una realidad. No se ha contrastado esta situación en artritis reumatoide ni en la artritis crónica juvenil. Es interesante señalar que la susceptibilidad a la enfermedad no depende de este gen sino más bien el grado de extensión y severidad de la enfermedad. Así por ejemplo, en la psoriasis, los niveles de este IL-1RN\*2 son más elevados en los que tienen la forma de aparición precoz y más severa. En la colitis ulcerosa, la colitis es mucho más extensa. También se ha visto en la halopecia areata, en la esclerodermia, en el liquen escleroso, en la diabetes. Es importante señalar que el antagonista del receptor de IL-1, lo que hemos denominado IL-1Ra, ES UNO DE LOS AGENTES ANTIINFLAMATORIOS MÁS PODEROSOS. Es una proteína de 22-25 kd, está estructuralmente muy relacionado con la IL-1  $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ . Esta proteína compete con estas interleucinas por su receptor y cuando se unen no produce ningún estímulo o señal de transducción. El gen IL-1Ra está localizado en el brazo largo del cromosoma 2, está muy estrechamente relacionado con la interleucina  $\alpha$  y la  $\beta$ . INTERLEUCINA-6.

La interleucina 6 —IL-6— es una citocina con una gran variedad de efectos biológicos. Hoy en día se sabe que la IL-6 y el «Factor Estimulante de los Hepatocitos» es la misma molécula. Se sintetiza y segrega tanto por células linfoides como por no linfoides. La IL-6 juega un papel muy importante como mediador de las reacciones inflamatorias agudas y crónicas.

Está formada por 212 aminoácidos que incluyen un péptido amino terminal de 28 aminoácidos. El gen que codifica la IL-6 humana está localizado en el cromosoma 7 —7p15-21— y tiene cinco

exones. La IL-6 se sintetiza en gran cantidad de células, como son los linfocitos T y B, los monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y algunas células tumorales. Salvo en células tumorales, la producción de IL-6 solo tiene lugar después de la activación celular. El número de sustancias conocidas que son capaces de inducir la IL-6 va en aumento y entre ellas se encuentran antígenos y mitógenos, lipopolisacáridos, IL-1, TNF $\alpha$ , PAF, virus y AMPc.

Existen receptores para la IL-6 en numerosas células. Existen dos receptores para la IL-6 con distinta afinidad. El receptor con alta afinidad constituye aproximadamente el 10% del número total de receptores, que pueden alcanzar hasta varios cientos a miles por célula. El receptor de la IL-6 está formado al menos por dos subunidades, una es una cadena de unión de 80 kD y la otra es una glicoproteína de 130kD que se une a la subunidad anterior exclusivamente en presencia de IL-6.

La interleucina 6, que tiene una importancia grande en la inflamación, actúa sobre muchas células incluso células inmaduras, especialmente de la médula hematopoyética, jugando un papel importante en la hematopoyesis. Las células CD34 consideradas como células progenitoras tienen receptores para la IL-6 al igual que ocurre con los monocitos de sangre periférica, los granulocitos y los linfocitos CD4. Los receptores para la IL-6 de los CD4 y de los monocitos, se manifiestan con gran intensidad y fuerza cuando están activados ya que en reposo su presencia es débil. También tienen los CD19, los linfocitos B y las células natural killer NK (CD56). Los CD8 tienen también receptores para la IL-6 pero en menor cuantía que los CD4. Los receptores de los granulocitos son de baja afinidad, mientras que los de las CD-4 y CD8 son receptores de alta afinidad.

Los efectos biológicos de la IL-6 son muy variados. Una de las principales funciones de la IL-6 es la de ser un inductor primario de reactantes de fase aguda. La IL-6 en el hígado estimula la producción de un gran número de proteínas como el fibrinógeno, la proteína C reactiva, la haptoglobina y la proteína sérica A del amiloide (24).

La interleucina-6, IL-6, es un factor importante en la producción de inflamación. Después de un insulto proinflamatorio la IL-6 se eleva, para descender después de desaparecer éste. Su disregulación

condiciona estados de inflamación crónica. Se encuentra elevada en el líquido articular de enfermos con artritis reumatoide. La IL-6 también actúa como factor de crecimiento celular, estando elevada en el mieloma múltiple. Se sabe que la estimulación crónica de la inflamación puede originar la aparición de plasmocitomas. En todos los casos de disregulación de la IL-6 con incremento crónico de la misma, el mononuclear fagocítico juega un papel muy importante. Posiblemente el factor más importante responsable del incremento de IL-6 sea la activación de la ciclooxigenasa-2, COX-2, con el consiguiente incremento de la PGE2. Son muchos los modelos experimentales, como puede ser la inyección intraperitoneal de aceite mineral en ratones, que ponen de manifiesto que la elevación de la prostaglandina E2 —PGE2—, secundaria a la activación de la COX-2, va seguida de la elevación de la IL-6.

## INTERLEUCINA-8

La IL-8 pertenece a una familia de polipéptidos de pequeño tamaño, entre 8-10 kD. Entre estos polipéptidos se encuentra la proteína básica de las plaquetas —PBP— el Factor 4 de las Plaquetas —PF4— y el Gamma Interferón T.

La IL-8 es una interleucina de gran poder quimiotáctico, selectivo para los neutrófilos con acción de larga duración, ya que no se destruye hasta pasadas varias horas. Comparte esta propiedad con dos péptidos, el NAP-2 o Péptido Activador de los Neutrófilos y el GRO-alfa, también denominado Factor Estimulador del Crecimiento de los Melanocitos (26) (27).

La IL-8 proviene de un precursor de 99 aminoácidos, muy rico en cisteína, que después es hidrolizado a 79 y a 72 aminoácidos. El gen que codifica la IL-8 se encuentra en el cromosoma 4 (4q12-21), en una zona próxima a los genes del PF4 y del gamma Interferón.

Muchas células sintetizan IL-8, entre las que se encuentran las endoteliales, los macrófagos, los fibroblastos, los queratinocitos, las células sinoviales y los condrocitos. Parece ser que los neutrófilos también pueden sintetizar IL-8. Estímulos importantes para la producción de IL-8 son la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y los lipopolisacáridos de origen bacteriano.

La IL-8 tiene un gran poder quimiotáctico para los neutrófilos, favorece la liberación de los enzimas del interior de los mismos y aumenta la actividad respiratoria del granulocito al igual que lo hace la fagocitosis. Los neutrófilos tienen un receptor para la IL-8. Hay de 20.000 a 75.000 receptores por célula. Es indudable que la IL-8, además de activar la motilidad de los neutrófilos y de favorecer la exocitosis, aumenta sus receptores de adhesión para unirse a las células endoteliales.

La inyección intradérmica de IL-8 no produce el habón que desencadena la histamina o el C5a, ni desencadena dolor ni prurito, pero produce exudación y acúmulo de neutrófilos, en especial alrededor de las vénulas de la dermis. A los pocos minutos, 15-30 de la inyección, se produce un reclutamiento de neutrófilos, efecto que está potenciado si actúan previamente factores vasodilatadores como la prostaglandina PGE2. El acúmulo de neutrófilos, y el reclutamiento de los mismos, perdura durante varias horas, cosa que no ocurre con el PAF ni con el C5a.

Si hemos señalado que la IL-8 es muy selectiva en su acción sobre los neutrófilos, también lo es, pero menos, sobre los eosinófilos y sobre las células basófilas. Estas últimas por acción de la IL-8 producen histamina y leucotrienos. Los polipéptidos NAP-2 y GRO $\alpha$  tienen capacidad de liberar espontáneamente IL-8, hecho que se incrementa por la acción del TNF, IL-1 o lipopolisacáridos.

## INTERLEUCINA-10

La interleucina 10 —IL-10— debe ser considerada como un «factor inhibidor de la síntesis de citoquinas». Es capaz de frenar la función efectora de los monocitos y de los macrófagos activados, impidiendo la aparición de la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF $\alpha$ , GM-CSF. Por otro lado inhibe la formación del INF $\gamma$  y de la IL-2 procedentes de los linfocitos LTH1. Parece ser que la IL-10 frena la transcripción de los genes de estas citoquinas y por lo tanto se reduce el mRNA, no pudiendo descartarse que haya una mayor degradación del mRNA ni estabilidad del mismo (28).

La IL-10 está elaborada fundamentalmente por macrófagos activados y también por linfocitos T transformados en línea linfoblastoi-

de por acción del virus de Epstein-Barr, con cuyo genoma tiene una gran similitud. El gen en donde se sintetiza la IL-10 está en el cromosoma 1.

Se ha señalado que la IL-10 tiene, al parecer, una acción reguladora de la normalidad de la mucosa intestinal. En la mucosa intestinal de la colitis ulcerosa, en la que hay elevación de citoquinas inflamatorias, como la IL-1, el TNF $\alpha$ , la administración sistémica de IL-10 o la aplicación local de la misma produce una reducción importante en la producción de IL-1 y de TNF por los macrófagos intestinales, así como también por los macrófagos de la circulación sanguínea.

En lo relativo a la formación de PGE2 es importante señalar que la IL-10 actúa inhibiendo a la ciclooxigenasa-2 —COX-2— y no a la COX-1.

Todo este conjunto de acciones permite comprender que la IL-10 sea considerada como «el factor inhibidor de la síntesis de citoquinas» (29). **LA IL-10 ES REALMENTE UNA PROTEÍNA ANTIINFLAMATORIA, LO QUE PERMITE AFIRMAR QUE ESTA MOLÉCULA ES Y SERÁ EN UN FUTURO PRÓXIMO UNA DIANA DE ESTUDIO PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN.**

Junto a la IL-10 quiero citar a la IL-4 que, al igual que la IL-10, desarrolla una actividad antiinflamatoria bloqueando la aparición de citoquinas inflamatorias. Experimentalmente se ha demostrado que la IL-4, en las articulaciones inflamadas, es capaz de frenar la acción de la IL-6, que como se sabe interviene en la inflamación y en la reabsorción ósea periarticular (30).

#### FACTOR DE NECROSIS TUMORAL —TNF— (Tabla IV)

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF) fue inicialmente identificado en la sangre de animales a los que se había inyectado endotoxina. Casi simultáneamente, en el sobrenadante de cultivos de macrófagos estimulados, se aisló una molécula a la que se llamó «caquectina», porque producía un cuadro de caquexia cuando se administraba de forma crónica a los ratones. Estudios posteriores demostraron que la secuencia de aminoácidos del TNF y de la «caquectina» era la misma por lo que se trataba de una misma sustancia (31).



TABLA IV

*Acciones compartidas de la IL-1, IL-6 y TNF*

	IL-1	IL-6	TNF
Fiebre	+	+	+
Somnolencia	+	-	+
Síntesis de proteínas de reacción de fase aguda	+	+	+
Activación linf-T	+	+	+
Activación linf-B	+	+	+
Activación síntesis de Ig	-	+	-
Proliferación de fibroblastos	+	-	+
Activación Stem cell hematopoyética	+	+	-
COX	+	-	+
Activación célula endotelial	+	-	+
Inducción IL-1, TNF, IL-8	+	-	+
Inducción IL-6	+	-	+
Activación sinovial	+		+
Radioprotección	+	-	+
Shock	+	-	+
Resistencia inespecífica a la infección	+	+	+

El TNF, factor de necrosis tumoral, es una citoquina que juega un papel muy importante en la inflamación, pero los efectos inicialmente estudiados del TNF estaban en relación con su capacidad de producir la necrosis de algunas células tumorales, por esto es por lo que recibió esta denominación. «In vivo» el TNF tiene importante efecto antitumoral, tanto mediado por acción directa sobre las células tumorales como mediado por diferentes mecanismos como son, la inducción en la formación de radicales libres de oxígeno, fragmentación de DNA y rotura de la membrana nuclear. Las líneas celulares tumorales que son resistentes a la acción de TNF lo son por inducción de moléculas protectoras como el superóxido dismutasa o proteína similares al TNF (32).

El TNF se produce en los monocitos, en los macrófagos, en los linfocitos, en las células endoteliales y en los linfocitos T activados.

Se ha aislado un polipéptido similar al TNF, al que se denominó linfotoxina. Linfotoxina y TNF tienen similares efectos biológicos sobre gran variedad de células, por esto al TNF de los macrófagos se le llama  $\text{TNF}\alpha$  y al de los linfocitos  $\text{TNF}\beta$ .

El TNF — $\text{TNF}\alpha$ — y la linfotoxina — $\text{TNF}\beta$ —, tienen el mismo peso molecular (17 kD) y al igual que la IL-1 tienen un precursor intracelular. Este precursor es de 26 kD y es rápidamente procesado ya que, cuando se estimula el macrófago, el TNF aparece rápidamente en la circulación. La secuencia de aminoácidos del  $\text{TNF}\alpha$  y de la linfotoxina es parecida, pero tienen suficientes diferencias estructurales en su molécula para que no existan reacciones cruzadas con anticuerpos frente a una y otra. Las dos moléculas tienen los mismos receptores de membrana, pero el  $\text{TNF}\alpha$  y el  $\text{TNF}\beta$  representan productos de dos genes distintos, pero relacionados, que se localizan en el cromosoma 6. La forma biológicamente activa del TNF es la de un trímero, mientras que su valoración en suero, que es una determinación antigénica, valora su forma monomérica, por lo que es posible encontrar cantidades elevadas de TNF en fluidos corporales sin que exista actividad biológica.

El TNF posee una amplia variedad de efectos biológicos, muchos de ellos en relación con su poder proinflamatorio. Tras la inyección del mismo a humanos se ha observado efectos sistémicos como fiebre, hipotensión y leucopenia. También existe una relación directa entre los efectos sistémicos de la endotoxina y el nivel de TNF circulante (33). Tras la inyección intravenosa de TNF se produce una granulocitopenia seguida posteriormente de leucocitosis y un aumento de la IL-6 circulante. También existe una activación de la coagulación, incluyendo una elevación del inhibidor del activador tisular del plasminógeno —PAI-1—. La respuesta observada es parecida a los cambios observados en la infección aguda y en los procesos inflamatorios (34).

El  $\text{TNF}\alpha$  o Factor de Necrosis Tumoral juega un papel muy importante en los cuadros de Sepsis, habiéndose visto una estrecha relación entre la cuantía del mismo en sangre y el pronóstico de la enfermedad (35). Esta relación ha sido clarísimamente demostrada en la sepsis meningocócica. En los enfermos que mueren de forma fulminante el valor sérico del  $\text{TNF}\alpha$  es extraordinariamente elevado.

Por otro lado la utilización, al menos en animales de experimentación, del anticuerpo frente al TNF $\alpha$  revierte la gravedad del shock séptico. En el hombre este hecho no está tan demostrado.

En un 10-15% de enfermos con infección meningocócica aparece sepsis meningocócica sin meningitis, por otro lado otras meningitis tienen alta mortalidad. Estamos todavía ignorantes en cuanto a saber porque unos enfermos con meningitis meningocócica tienen un comportamiento relativamente benigno, mientras que otros evolucionan rápidamente a una forma de sepsis agudísima. No hay referencias en cuanto a la virulencia de los microorganismos. Dada la relación que tiene la gravedad con la elevación del TNF $\alpha$ , se ha sugerido que haya individuos predispuestos porque tengan una especial predisposición genética por tener un gen de TNF $\alpha$  con gran capacidad de respuesta a los estímulos inflamatorios, bacterianos principalmente. La gravedad en el paludismo también guarda relación con el TNF $\alpha$ , así los que mueren de malaria cerebral tienen niveles más altos los niveles de TNF $\alpha$  en plasma que los que tienen malaria no complicada.

La producción de TNF $\alpha$  está regulada por elementos variables dentro del grupo de histocompatibilidad mayor. Hay un polimorfismo que puede actuar sobre la regulación del TNF. El polimorfismo está en la zona promotora del gen del TNF $\alpha$ , y agrupa a una simple sustitución de una base, la 308. El alelo TNF-1 o alelo1, tiene guanósina en la posición 308 mientras que el TNF-2, alelo 2, tiene adenosina. Cuando la cuantía del alelo 2 supera al alelo 1 la expresión del TNF es mayor que cuando el alelo 1 supera al alelo 2.

En niños de Gambia se ha demostrado que los homocigotos para el alelo TNF-2 tienen una especial susceptibilidad a la malaria cerebral. Aquellos que con malaria no tienen complicaciones cerebrales, tienen una frecuencia del TNF-2 similar a los controles. La presencia del alelo TNF-2 genera mayor riesgo de formas fulminantes de meningitis y el riesgo relativo de muerte en los TNF-1/TNF-2, es decir heterocigóticos, es 2,5 comparado con los enfermos homocigóticos para el alelo TNF-1.

Cualquier factor que pueda controlar la secreción de TNF $\alpha$  puede ser importante en el determinismo de la severidad de la infección meningocócica. Parece ser que el tener un homocigotismo de TNF-

2 no predispone a tener infecciones por meningococo más frecuentes, lo que pasa es que cuando se tiene, la gravedad del proceso es infinitamente mayor. Resumiendo podemos decir que la gravedad de la meningococemia es proporcional a la intensidad de la presencia del alelo TNF-2, mientras que la propensión a padecer malaria del sistema nervioso reside en el homocigotismo para el TNF-2.

El TNF $\alpha$  estimula el metabolismo del ácido araquidónico en las células trofoblásticas. El TNF $\alpha$  altera la expresión del COX2 en las células trofoblásticas modificando la expresión de COX-2 durante los primeros meses del embarazo. La dexametasona inhibe esta acción.

El TNF activa los linfocitos T, incluyendo la expresión de los receptores para IL-2. Los linfocitos B también son estimulados. El TNF induce la síntesis y paso a la circulación de polipéptidos innoestimulantes como son la IL-1 y la IL-6 producidas en monocitos, fibroblastos y células endoteliales. A su vez estas citoquinas aumentan la acción del TNF sobre los linfocitos. Sobre células endoteliales en cultivo estimula la producción de PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PAF.

El TNF $\alpha$  comparte las mismas propiedades biológicas, no inmunológicas, de la IL-1, pero a pesar de ciertas similitudes, los receptores del TNF y de la IL-1 son distintos y específicos. Tanto IL-1 como TNF producen una regulación negativa que se explica porque ambos estimulan mensajes intracelulares similares por diferentes caminos y producen una alteración de la misma cascada de metabolitos intracelulares. Podemos decir que la intervención e importancia del TNF en la inflamación es indiscutible.

## PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas son los autacoides más abundantes, encontrándose prácticamente en todos los tejidos y fluidos del organismo. Su producción se incrementa por una gran variedad de estímulos y se producen en un tiempo muy corto, de minutos. Producen unos efectos variadísimos, el espectro de acción es muy amplio y desde hace años se ha visto que la inhibición de la síntesis es un camino de gran interés para la terapéutica antiinflamatoria.

Como señalan S. Moncada, RJ Flower y JR Vane, las prostaglandinas son las moléculas que, por su variadísima acción (36,37) han despertado mayor interés en la investigación biológica.

En el año 1930 Kurzrok y Lieb demostraron que tiras del músculo uterino se relajaban o se contraían cuando eran expuestos a semen humano (38). Goldblatt, en Inglaterra, y Euler, en Suecia, de manera independiente, describieron con exactitud que el líquido seminal tiene capacidad de contraer y de deprimir la actividad de los músculos. Fue Euler el primero en señalar que la sustancia activa era un ácido graso soluble, al cual denominó por su procedencia «prostaglandina» (39).

Pasaron más de 20 años hasta que se pudo obtener de manera cristalina las dos primeras prostaglandinas, la prostaglandina E1 —PGE1— y la F1 —PGF1a—, lo que permitió estudiar su estructura química. La base de la estructura química es la de un ácido carboxílico insaturado de 20 átomos de carbono unidos a un anillo de ciclopentano.

En el año 1964, Bergström y van Dorp, también de manera independiente, utilizando líquido seminal de la oveja pudieron sintetizar a partir del ácido araquidónico la prostaglandina E2 —PGE2— (40). En el año 1973 los trabajos de diversos investigadores, permitieron caracterizar y señalar la presencia de otras prostaglandinas inestables. Son los endoperóxidos cíclicos como la prostaglandina G2 —PGG2— o prostaglandina 15-hidro OOH PGH2 y la prostaglandina H2 o PGH2. Posteriormente se caracterizó el tromboxano A2 —TxA2— y su producto metabólico el tromboxano B2 (41) y más tarde, en el año 1976, Moncada y colaboradores descubrieron la prostaciclina O, llamada PGI2 (42). La enzima clave en la formación de estos compuestos es, como después veremos la ciclooxigenasa —COX—.

Estos interesantes hallazgos, en la vía metabólica del ácido araquidónico, se vieron ampliados al demostrar que el ácido araquidónico sigue otra vía metabólica independiente a la de la COX, dependiente de otra enzima clave, la lipooxigenasa, que lo convierte en leucotrienos y en compuestos como el ácido 12-hidroxi-peroxi araquidónico (HPETE) y el ácido 12 hidroxia-raquidónico (HETE), lo que permite afirmar que las prostaglandinas clásicas representan

solo una fracción de los productos con actividad fisiológica derivados del ácido araquidónico.

Se sabe que la inyección intradérmica, intravenosa o intraarterial de prostaglandinas, produce efectos muy similares a los de la inflamación. En el territorio cutáneo la inyección tanto de prostaglandina E<sub>2</sub> PGE<sub>2</sub> como de prostaciclina PGI<sub>2</sub> producen eritema y aumento del flujo local vascular. Esta vasodilatación es de efecto duradero ejerciendo, al mismo tiempo, un freno sobre la acción vasoconstrictora de la norepinefrina y de la angiotensina. El eritema inducido por la inyección intradérmica de prostaglandinas dura aproximadamente unas diez horas, en contraste con el corto periodo de tiempo que dura la vasodilatación sobre los vasos superficiales venosos de otros preparados vasodilatadores. Señalaré que esta acción de vasodilatación duradera no se produce en otros territorios vasculares de la economía.

Las prostaglandinas aumentan la permeabilidad vascular en el territorio postcapilar y en las vénulas colectoras habiéndose señalado que este aumento de la permeabilidad puede deberse a la contracción de las células del endotelio venular. Hay una potenciación o sinergismo entre la PGE<sub>2</sub> y la bradiquinina, habiéndose señalado que algunos de los efectos vasculares de la bradiquinina pueden ser debidos a estimulación de la síntesis de prostaglandinas.

La base molecular de las prostaglandinas es la de un ácido graso unido a un anillo de ciclopentano. El ácido graso tiene 20 átomos de carbono, con 3, 4 o 5 dobles enlaces. Así tenemos el ácido 8,11,14-eicosatrienoico o ácido dihomo- $\gamma$ -linoleico, el ácido 5,8,11,14 eicosatetraenoico o ácido araquidónico —AA— y el ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico. Las prostaglandinas que derivan del ácido 8,11,14-eicosatrienoico con tres dobles enlaces llevan el sufijo 1 —PG1—, las que tienen dos enlaces llevan el sufijo 2 —PG2— y derivan del ácido araquidónico, las que proceden del ácido 5,8,11,14,17 eicosapentaenoico tienen el sufijo 3 —PG3—. En el hombre las prostaglandinas importantes son las que tienen el sufijo 2 procedentes del ácido araquidónico mientras que las que tienen el sufijo 3 son abundantes en los animales marinos (fig. 1).

La prostaglandina E —PGE<sub>2</sub>— se denomina así en atención a su solubilidad en dietil éter y la prostaglandina F —PGF<sub>2</sub>— en atención

FARMACOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN

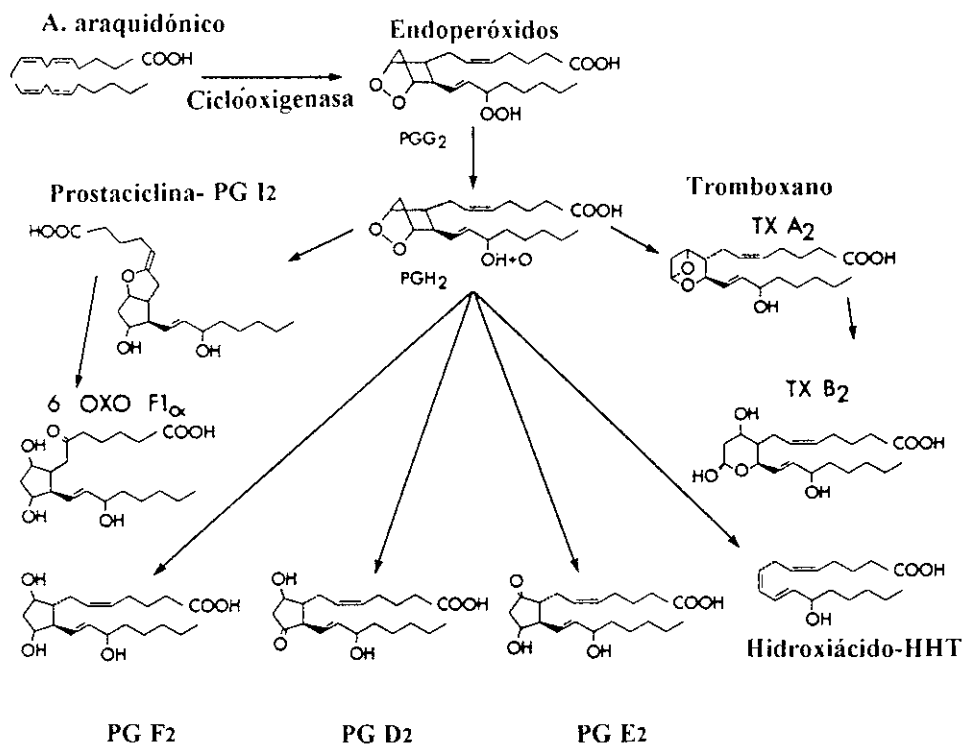


FIG. 1. Metabolismo del ácido araquidónico. Prostaglandinas. Tromboxano.

a su solubilidad en buffer de fosfatos. Los tromboxanos son un grupo de moléculas próximas a las prostaglandinas.

El ácido araquidónico se encuentra incorporado a los fosfolípidos de las membranas celulares, en especial a la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, pero puede derivar también de los ácidos de la dieta, como el ácido linoleico y linoléico, por elongación y desaturación posterior. Es la fosfolipasa A<sub>2</sub> la enzima que provoca la liberación del ácido araquidónico. Esta fosfolipasa, que es el factor limitante en la formación de prostaglandinas, en su forma preferentemente citoplasmática, se activa por concentraciones micromolares de calcio iónico que favorece la aproximación de la misma a la membrana, sobre la cual se fija. Esta activación se produce por diversos estímulos sobre la membrana celular, físicos, químicos, hormonales, neurohormonales.

La síntesis de las prostaglandinas puede ser rápida, explosiva y de poca duración, pero también puede ser de intensidad menor pero de mayor duración. Probablemente el factor que determina uno u otro comportamiento está en función de la duración de la actividad de una enzima clave para la formación de las mismas, la ciclooxigenasa. Las células que no tienen capacidad de su resíntesis, tienen una producción rápida, intensa, pero corta, como es el caso de las plaquetas, de los neutrófilos, de las células cebadas, mientras que otras, que tienen capacidad de resintetizarlo, como las células endoteliales, las musculares lisas, los macrófagos-fagocíticos, liberan prostaglandinas durante mayor tiempo.

La enzima «ciclooxigenasa» —COX— cuya existencia se conoce desde antes del año 1970, propicia la oxigenación del ácido araquidónico con la formación de un endoperóxido cíclico, al formar el oxígeno un puente entre el carbono 9 y el carbono 11.

La COX es una proteína integrante de las membranas, en especial de las membranas microsomales y de la membrana nuclear, su gen se encuentra en el cromosoma 9. Recientemente se ha descrito una segunda ciclooxigenasa, la COX2. El ácido acetilsalicílico tiene la capacidad de acetilar la COX-1 actuando sobre la serina 529, inutilizando su función.

Una segunda oxigenación introduce otro oxígeno en el carbono 15, produciéndose la prostaglandina G —PGG2—. Por una posterior peroxidación la PGG2 pasa a PGH2 (PG-1) de la que derivan el resto de las prostaglandinas y la familia de los tromboxanos. Para la formación de PGG2 se requiere el Hemo como cofactor, mientras que para el paso de PGG2 a PGH2 se necesita triptófano.

Estos dos endoperóxidos, el PGG2 y el PGH2, son inestables, con una vida media de 5 minutos. Sufren un proceso de isomerización por actividad enzimática o no enzimática. Por acción de la enzima PGD sintetasa, PGE sintetasa y PGF sintetasa se forma la PGD2, la PGE2 y la PGF2. A partir de la PGE2 se forma la PGA2, la PGB2 y la PGC2, productos que probablemente se forman en los procesos de extracción por deshidratación y nueva isomerización y tal vez no jueguen ningún papel biológico «in vivo».

El endoperóxido PGH2 se metaboliza a dos compuestos inestables, de alto poder biológico, que tienen una estructura diferente a



la prostaglandina inicial. Uno de estos es el tromboxano A2 o TxA2 formado por la acción de la enzima tromboxano sintetasa. Se aisló por primera vez de las plaquetas humanas. Tiene una vida media muy corta, de unos 30 segundos y contiene en su estructura un anillo oxano, en vez del ciclopentano que tienen las prostaglandinas. Por acción no enzimática pasa a una forma estable, el tromboxano B2 (TxB2) (41).

La otra ruta metabólica del endoperóxido PGH2 es la de la prostaciclina —PGI—. Se forma por acción de la «prostaciclina sintetasa» que se aisló de los tejidos vasculares (42). Es también un compuesto muy inestable de una vida media de tres minutos. La prostaciclina tiene una estructura con dos anillos unidos por un puente de oxígeno entre los carbonos 6 y 9. Por acción no enzimática se hidroliza a un compuesto estable que es la 6-ceto-PGF1.

Fue Moncada junto con Grylewski, Bunting y Vane, en el año 1976 (42), los que demostraron que en el metabolismo de las prostaglandinas, con independencia de la PGF2, PGE2 y PGD2 se forma un compuesto derivado de la PGG2 y de la PGH2, no prostaglandínico, al que llamaron tromboxano A2 —TAX2—. Caracterizaron también la presencia en las plaquetas de la enzima responsable, la «tromboxano sintetasa». Lo importante es que el factor vasoconstrictor aislado de la aorta del conejo era el tromboxano.

El tromboxano, o TxA2, comparte con los endoperóxidos de prostaglandinas dos importantes propiedades biológicas. Tiene gran capacidad contráctil sobre secciones de la aorta de los conejos y al mismo tiempo es capaz de agregar con gran intensidad a las plaquetas «in vitro». Me interesa resaltar, que estos mismos autores, dirigidos por Moncada, descubrieron, en los microsomas de los vasos sanguíneos, una enzima capaz de transformar los endoperóxidos PGG2, en una sustancia inestable con gran poder de relajar los vasos, es decir con una actividad opuesta a la del tromboxano y que además inhibe la agregación de las plaquetas. A esta sustancia con poder vasodilatador sobre los vasos mesentéricos y celiacos, se denominó PGX pero por otro lado era capaz de producir contracción de las fibras musculares lisas del estómago, del recto de los pollos, de la traquea de las cobayas, del ileo de las cobayas pero con una potencia menor que la desarrollada por la PGH2 o PGG2. El colon

de las ratas no se contrae con los endoperóxidos o con la PGX, en cambio si lo hace por la PGE<sub>2</sub> y la PGF<sub>2</sub>. Numerosas experiencias demostraron que los microsomas de la aorta, incubados con endoperóxidos PGG<sub>2</sub> o PGH<sub>2</sub>, producen la PGX tras la desaparición completa del endoperóxido. Moncada y colaboradores demostraron que la PGX es treinta veces más potente que la PGR<sub>2</sub> y la PGD<sub>2</sub>.

Numerosas experiencias demostraron que los microsomas de la aorta, incubados con endoperóxidos PGG<sub>2</sub> o PGH<sub>2</sub>, producen la PGX tras la desaparición completa del endoperóxido. Esta PGX se corresponde con la prostaciclina —PGI<sub>2</sub>—.

Los endoperóxidos se pueden transformar en 17-hidroxi HHT formándose simultáneamente el malondialdehído. El HHT también se puede formar por vía no enzimática, por acción de la tromboxano sintetasa.

Es importante señalar que los endoperóxidos se metabolizan hacia una u otra vía, hacia uno u otro compuesto, dependiendo del tejido en el cual se metabolicen. Los pulmones y el bazo tienen capacidad de sintetizar toda la gama de productos, mientras que otros, como las plaquetas, sintetizan principalmente tromboxano —TxA<sub>2</sub>— y las células endoteliales sintetizan prostaciclina —PGI<sub>2</sub>—. El TxA<sub>2</sub> es un poderoso agregante de las plaquetas y vasoconstrictor, mientras que la PGI<sub>2</sub> es vasodilatador y antiagregante, tienen funciones diferentes que se manifiestan sobre la misma zona de contacto entre la sangre circulante y el endotelio-pared vascular.

Ya se ha señalado como el ácido araquidónico puede seguir una vía metabólica diferente a la de la ciclooxigenasa —COX—. Esta es la vía de la enzima «lipooxigenasa», vía que ha sido reconocida con posterioridad, posiblemente porque la lipooxigenasa no se encuentra en todos los tejidos (43).

Los estímulos que en la inflamación estimulan la producción de las prostaglandinas son variados y depende mucho también de la célula sobre la cual actúen (44). Son factores muy importantes en el desencadenamiento de la síntesis de prostaglandinas la endotoxina, el Zimosan, la bradiquinina, la IL-1, la inmunoglobulina IgE, especialmente en las células cebadas o basófilas. El colágeno, la trombina, los complejos inmunes y el C3a en las plaquetas y macrófagos.

Los monocitos, por acción de la endotoxina, producen ciclooxigenasa. Sobre los fibroblastos la IL-1 eleva los niveles de ciclooxigenasa por un periodo largo, de 3-6 horas, con producción de prostaglandinas (45).

La edad puede modular la intensidad de la respuesta o producción de prostaglandinas. Se ha visto que los esplenocitos, macrófagos y polinucleares procedentes de animales de edades avanzadas producen más PGE<sub>2</sub> que los monocitos de los jóvenes. Esto se ha visto también en otros tejidos. Esto indica que hay una respuesta mayor de derivados del ácido araquidónico en la tercera edad de la vida, lo que puede tener importancia clínica, ya que altas concentraciones de PGE<sub>2</sub> produce un freno y depresión inmunológica mediada por los linfocitos T. En este sentido se ha visto que los monocitos y los polinucleares de los individuos mayores tienen una mayor respuesta al lipopolisacárido, por aumento en la producción y actividad de la ciclooxigenasa COX (46).

La COX se expresa de manera constitutiva en las células endoteliales en su forma de COX-1 siendo responsable de la producción continua de prostaciclina, que mantiene la integridad vascular. Por su parte la COX-2 que es una isoforma que está inducida por la acción traumática o la acción de las citoquinas. También las células endoteliales se estimulan por la acción del complemento y producen fundamentalmente PGE<sub>2</sub> y tromboxano A<sub>2</sub>, así como también prostaciclina. Se ha visto que esta acción se debe a la puesta en marcha de la COX2, es decir de la ciclooxigenasa inducida y de la tromboxano sintetasa. Esta respuesta no es por acción directa del complemento sino por la producción de interleucina 1 -IL-1a, que de manera autocrina actúa sobre la propia célula endotelial.

Con la edad el comportamiento de las dos isoformas de la COX, la 1 y la 2 en los macrófagos es diferente, aumentando los niveles de la COX-2.

Los macrófagos de animales añosos tienen la capacidad de formar mas prostaglandina E<sub>2</sub> —PGE<sub>2</sub>—. Esto es secundario a una mayor expresión de la COX.2 y no a un incremento en la cuantía de ácido araquidónico liberado. Curiosamente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que actúa como activador de la COX se encuentra elevado en los monocitos y macrófagos de individuos mayores.

Es muy posible que este incremento en la formación de la COX.2 que aparece con la elevación de la edad se deba a un aumento en la producción de radicales libres. Se sabe que los radicales oxidativos activan el «factor tisular de transcripción» el NF-kB.

Indudablemente todos estos hechos pueden tener una gran importancia en los mecanismos del envejecimiento y tal vez no esté lejos de la realidad decir que en el envejecimiento está activada, de forma crónica, la cascada de la inflamación. Se ha señalado que con la edad hay aumento de la IL-6, lo que podría en cierta medida justificar el incremento de la patología inflamatoria y autoinmune que se presenta en las edades avanzadas de la vida.

Basándose en estos razonamientos hay que tener presente la posible utilización de antioxidantes, incluida la vitamina E, que reducen la activación del NF-kB y con ello la activación reducida de la COX.2 así como también de la PGE2, que favorece la inflamación.

Es importante comentar algunos aspectos estructurales de la ciclooxigenasa 1 y 2.

La molécula de ciclooxigenasa-1, la COX-1 tiene tres pliegues independientes, uno tiene actividad de Factor de Crecimiento Epidérmico, otro dominio que es el de fijación a la membrana y otro que es el dominio enzimático. La fijación de la enzima a través de este pliegue o bucle sugiere que la enzima está integrada dentro de la capa lipídica de la membrana (47).

Estructuralmente la COX-1 forma un canal que permite la entrada del ácido araquidónico y así tiene acceso al lugar donde se encuentra la actividad enzimática. El AA penetra directamente desde la propia bicapa de lipídicos. Algunos fármacos antiCOX-1 impiden la entrada del ácido araquidónico al interior de este conducto. La tirosina 385 y la serina 530 están en el extremo de la zona activa. La aspirina acetila a la COX-1 en la serina 530, impidiendo así la entrada del araquidónico. El flurbiprofen la arginina 120 se une formando una unión con la tirosina 385 impidiendo, de este modo, el contacto del AA con la zona activa-enzimática de la COX.1.

La COX-2 tiene una zona activa más larga y grande que la COX-1 y permite la entrada de estructuras mayores. La inhibición selectiva de la COX-2 se produce por la presencia de la valina en

la posición 523, en lugar de la isoleucina que se encuentra en la COX-1.

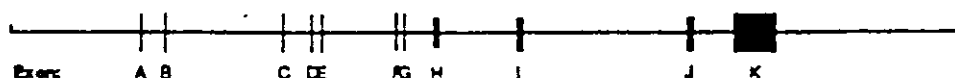
Needleman demostró, junto con su grupo, que las citoquinas inducían la expresión de la enzima COX, así como también los lipopolisacáridos la incrementaban en los monocitos humanos «in vitro» y en los macrófagos peritoneales «in vivo» del ratón. También señaló que la dexametasona inhibía la síntesis de la COX.

La COX-2 y la COX-1 tienen un gen diferente. El gen COX-1 está en el cromosoma 9 y el de la COX-2 en el cromosoma 1 (48). Tienen una estructura similar y se diferencian porque el exon 1 y 2 de la COX-1, que contiene la zona del comienzo traslacional y la señal peptídica se condensa en un solo exon en la COX-2. El gen de la COX-2 es más pequeño que el de la COX-1. El primero tiene 8 kb y el segundo 22 kb. La COX-1 tiene una transcripción rápida con un procesamiento de mRNA también rápido. Esto no ocurre con el gen de la COX-2 que tiene una zona 3' amplia que no se traduce. La COX-1 está continuamente en transcripción, generando siempre el mRNA y la proteína, existiendo en todas las células una acción permanente de la COX-1 sobre la molécula de ácido araquidónico. Esto no ocurre con la COX-2 que necesita un estímulo inductor. (Fig. 2)

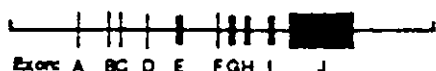
La COX-1 se encuentra prácticamente en todas las células, pero su acción más importante, de manera continua, se presenta en el tracto gastrointestinal, en las plaquetas, en las células endoteliales, en la zona medular renal de los túbulos colectores y en el intersticio renal. Como se ha podido saber, por estudios de hibridación *in situ* y de inmunohistoquímica, la COX-2 en situaciones basales solamente se encuentra en el cerebro y en la corteza renal.

Así la COX-2 se ha encontrado en las máximas concentraciones en células del hipocampo de la rata adulta, en otras zonas del cerebro los niveles de COX-2 son más reducidos. En el riñón, por hibridación *in situ*, se ha encontrado COX-2 en las células de la mácula densa del aparato yuxtaglomerular y en una zona próxima a la zona gruesa del asa ascendente de Henle. Esto indica que juegan un papel importante en la regulación de líquido intravascular, por esto las situaciones de restricción salina producen una elevación del mRNA de la COX-2. Por inmunoanálisis celular se ha encontrado COX-2 en células de las articulaciones y de sus estructuras periféricas, en las

**COX-1: 22.5 kb**



**COX-2: 8 kb**



Obsérvese el tamaño mayor de la COX-1 y como los exones J y K en la COX-2 están representados por un solo exón.

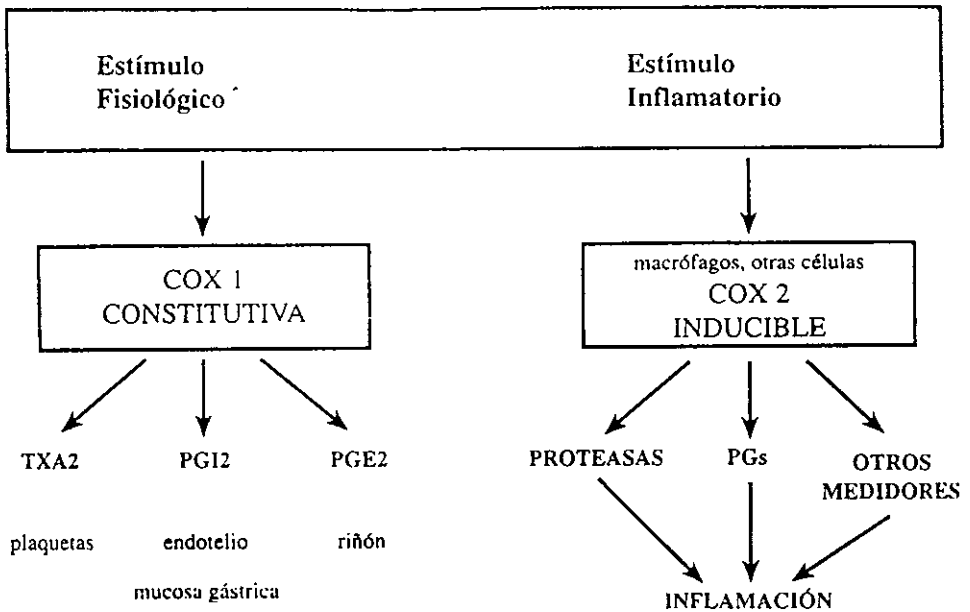
Fig. 2. Estructura de los genes de la COX-1 y la COX-2.

células sinoviales, en los fibroblastos sinoviales, en el endotelio vascular, en los mononucleares que infiltran las zonas, en los condrocitos, en los osteoblastos subcondrales y en las células de la médula próximas a la articulación. Existe un paralelismo entre la cuantía de material inmunorreactivo a la COX-2 con la cuantía de infiltración de células mononucleares.

El mRNA de la COX-2 aparece rápidamente, después de la aplicación del estímulo inflamatorio, en la artritis por adyuvantes e igualmente ocurre con la expresión de su proteína, la PGE<sub>2</sub>. Esta respuesta proinflamatoria está frenada en un 80-85% al aplicar el inhibidor específico de la COX-2, el SC58125 (Searle)(49).

Activan el gen de la COX-2 las moléculas proinflamatorias IL-1, el TNF $\alpha$  y los lipopolisacáridos, el suero, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento de los fibroblastos y el TNF- $\beta$ . Inhiben la activación de la COX-2 los glucocorticoides y las citoquinas IL-4 e IL-13 (Fig. 3).

Las prostaglandinas actúan sobre receptores existentes en las células diana y éstos son diferentes para cada prostaglandina. Como se ha señalado anteriormente la prostaciclina produce vasodilata-



La COX-1 interviene en el mantenimiento funcional y citoprotector. La COX-2 responde ante estímulos inflamatorios y genera moléculas inflamatorias.

Fig. 3. *Comportamiento diferente de las dos isoenzimas. Ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2).*

ción y antiagregación plaquetaria . El tromboxano es un intenso agregante y vasoconstrictor. La PGD2 inhibe la agregación de las plaquetas y la degranulación de los polimorfonucleares, pero desencadena broncoconstricción importante y aumenta la vascularización de la mucosa nasal con producción de rinitis. La PGE2 activa a los leucocitos y a las plaquetas, produce fiebre, edema y eritema, además actuando de manera sinérgica con la bradiquinina, la IL-1 y la histamina desencadena broncoconstricción importante y aumenta la vascularización en la mucosa bronquial. La PGE2 es la prostaglandina inflamatoria.

Son muchos los factores que se relacionan con la producción de dolor en la inflamación. Posiblemente las prostaglandinas, que se liberan en el foco inflamatorio, actuando sobre los receptores del dolor, los sensibilizan para que otras sustancias, como la bradiqui-

nina, la histamina, la serotonina, puedan desencadenarlo (50). No obstante las prostaglandinas a altas concentraciones pueden producir directamente dolor. En estos casos el dolor es de mayor duración que el desencadenado por las quininas o la histamina.

## LEUCOTRIENOS

Reciben este nombre porque se forman en los leucocitos y tienen en su molécula, de 20 átomos de carbono, tres dobles uniones conjugadas. Algunos leucotrienos se corresponden con la clásica Sustancia de Reacción Lenta de la Anafilaxis —SRS-A— (Slow Reacting Substance), tienen gran poder biológico y juegan un papel importante en la inflamación. Al igual que las prostaglandinas, derivan del ácido araquidónico —AA— por acción enzimática de la enzima 5-lipooxigenasa. La 5-lipooxigenasa es para los leucotrienos lo mismo que la ciclooxigenasa para las prostaglandinas.

Se han caracterizado dos grupos mayores de leucotrienos. De uno de ellos, los primeramente reconocidos, los llamados «sulfidopépticos», ya se sabía de su existencia hace unos 50 años y están representados por los leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. El otro grupo que solo se conoce desde el año 1980, está representado por el ácido 5S-12R-dihidroxi-6, 14-Cis-8,10 transeicosatetraenoico o leucotrieno B<sub>4</sub>-LTB<sub>4</sub>. De un grupo y de otro, se ha podido estudiar su síntesis, delimitando la línea de enzimas comunes y no comunes en el camino de su biosíntesis a partir del ácido araquidónico. Además se ha podido identificar las vías de inactivación de estos productos, así como conocer la relación estructura-función e identificar la heterogeneidad de sus receptores, demostrándose la potente acción proinflamatoria tanto en animales como en los hombres.

Un aspecto que importa señalar es que las células responden ante cualquier perturbación de su membrana, tanto en estados fisiológicos como patológicos, elaborando un grupo diferente de productos producidos por oxidación del ácido araquidónico —AA—. El diferente perfil de metabolitos activos del ácido araquidónico depende de la maquinaria bioquímica de cada tipo celular, así como de la clase de receptores que se encuentran en las células que rodean a las células activadas, es decir del microambiente.



La mayoría de las células tienen el equipo enzimático necesario para el camino oxidativo de la ciclooxigenasa, mediante la intervención de cinco o más sintetasas. Por el contrario el camino oxidativo de la 5-lipooxigenación no está tan universalmente distribuido entre las células.

Hay que señalar que ante una respuesta inflamatoria la formación de leucotrienos, tanto cuantitativa como cualitativamente, se expresa con marcada especificidad celular. La enzima 5-lipooxigenasa se encuentra en los neutrófilos (51), en los eosinófilos, en los basófilos, en los monocitos y en las células cebadas. En todas ellas necesita calcio y ATP para actuar sobre la molécula de ácido araquidónico. Estas diferentes células del organismo tienen además una cierta especificidad para producir uno u otro de los leucotrienos. Los polimorfonucleares producen fundamentalmente LTB<sub>4</sub> y en muy escasa cantidad, aproximadamente una décima parte LTC<sub>4</sub>. Los eosinófilos sin embargo se comportan de manera diferente, produciendo grandes cantidades de LTC<sub>4</sub> y pequeñas cantidades de LTB<sub>4</sub>. Los mononucleares de la sangre periférica, y los macrófagos alveolares, producen fundamentalmente LTB<sub>4</sub> y mucho menos LTC<sub>4</sub>. Una cuantía de 10<sup>6</sup> macrófagos alveolares son capaces de producir de 100 a 400 ng de LTB<sub>4</sub>, lo que representa 20 veces más la cantidad de LTC<sub>4</sub> sintetizada. Los mastocitos preferenciales de las mucosas, así como los derivados de la médula hematopoyética, producen fundamentalmente LTC<sub>4</sub> y mucho menos LTB<sub>4</sub>, especialmente cuando son activados por la IgE. Curiosamente los mastocitos humanos del tejido conjuntivo en respuesta a una activación inmunológica producen, fundamentalmente como producto oxidativo del ácido araquidónico, la prostaglandina D<sub>2</sub>.

El grupo de células que responden produciendo fundamentalmente LTB<sub>4</sub> son células relacionadas con la actividad endotelial, adherencia a las mismas, quimiotaxis de los polinucleares, mientras que las encargadas de producir fundamentalmente LTC<sub>4</sub> están relacionadas con el tono y/o actividad vascular, tanto arteriolar como venular, con incremento de la permeabilidad. También la cuantía del leucotrieno producido depende del tipo de estímulo. No es la misma respuesta cuando el estímulo es el calcio ionóforo, el complejo antígeno-anticuerpo o el zimosan. Además del ácido araquidónico -AA-5,8,11,14-eicosatetraenoico, la 5-lipooxigenasa puede actuar so-

bre otros sustratos, así la 5-lipooxigenasa extraída de los polimorfos nucleares de la cobaya y del hombre actúa sobre el ácido 5,8,11,14,17-cis-eícosapentaenoico, el cual se encuentra fundamentalmente en los animales o en el hombre cuando toman dieta rica en grasa procedente del pescado. Otros sustratos menos eficaces son el ácido linoleico 9,12-cis-octadecadienoico y el linoleico 9,12,15-cis-octadecatrienoico, ya que les falta el enlace 5-6-oleicínico.

La 5-lipooxigenasa humana tiene gran homología con la de otros mamíferos, teniendo una identidad de más del 90% con la de la rata. La zona homóloga, necesaria para su función, está próxima al extremo carboxi-terminal. La 5-lipooxigenasa se encuentra en el citosol de la célula. Su forma dimérica activa es calcio dependiente. Para actuar necesita unirse a la membrana citoplasmática por intermedio de una proteína de activación. El calcio favorece esta unión, ya que ésta se rompe si se sustrae el calcio de la célula.

La lipooxigenasa introduce un oxígeno en la posición C5 de la molécula del ácido araquidónico, formándose el ácido 5-hidroxi-peroxi-eicosatetraenoico (5-HPETE). Este, por acción enzimática —peroxidación— o no enzimática, se transforma, al perder un hidrogeno en la posición C10, en el ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5-HETE), formándose el leucotrieno A4 —LTA4— (Fig. 4).

Después de la acción de la 5-lipooxigenasa, el 5-HPETE es transformado por la acción de una dehidrasa en el ácido 5,6-trans-oxido-7,9trans-11,14cis-eicosatetraenoico, que es el leucotrieno A4 o LTA4. Puede por otro lado ser hidrolizado a su forma alcohólica, dando el ácido 5S-hidroxi-6,trans-8,11,14-cis-eicosatetraenoico. Por hidrólisis no enzimática el LTA4 produce un producto inactivo, isómero de la LTB4, que se corresponde con el 5S,12R- y el 5S,12S-dihidroxi-6,8,10-trans-14,cis-eicosatetraenoico ácido o 6-trans-LTB4 diastereoisómero, así como una cantidad pequeña del ácido 5,6-dihidroxi-eicosatetraenoico.

Una nueva enzima, la hidrolasa LTA4, o epóxido-hidrolasa, hidroliza al LTA4 para dar origen a su forma hidroxí-ácido, el LTB4, que se encuentra prácticamente en todas las células. La hidrolasa LTA4 es una enzima citosólica, tiene 610 aminoácidos, actúa sobre la LTA4 sin requerir cofactores o calcio (52). El LTA4, en la propia célula donde ha sido sintetizada, pasa a LTB4 por la acción de una

FARMACOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN

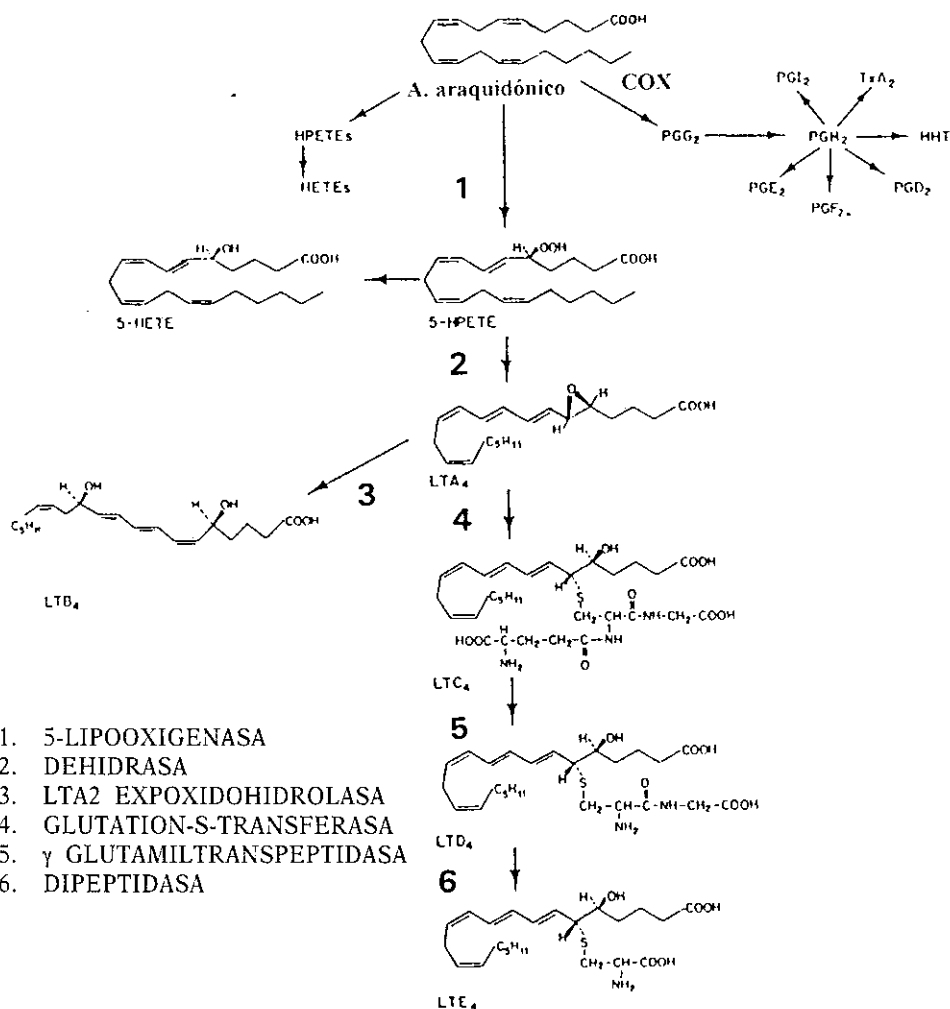


FIG. 4. Formación de los leucotrienos.

segunda hidrolasa. Por hidrólisis no enzimática el LTA<sub>4</sub> pasa a una forma isomérica de LTB<sub>4</sub> no activa. Por otro lado, la LTA<sub>4</sub> puede salir de la célula de origen para ser transportada y metabolizada a otras células distantes, en especial a los monocitos. Este transporte de LTA<sub>4</sub> juega un papel muy importante en los focos inflamatorios al permitir la biosíntesis de otros leucotrienos en células que no sintetizan LTA<sub>4</sub> «de novo». Otra enzima, la LTC<sub>4</sub>-sintetasa conjuga

al glutation reducido —GGS—, mediante la enzima glutation-S-transferasa, en el carbono 6 —C6— del LTA4 con producción de un «sulfidopéptido», el leucotrieno-C4 —LTC4— (53). En general la formación de LTC4 y del LTB4 se realiza en el territorio intracelular, pese a haberse caracterizado una epóxido hidrolasa del LTA4 en el territorio extracelular y en el plasma, pero de significación fisiológica poco clara.

Formado el LTC4, éste pasa a LTD4 y éste a LTE4 por acción de una gammaglutamiltranspeptidasa y de una dipeptidasa respectivamente. El paso de LTC4 a LTD4 y a LTE4 se realiza por hidrólisis, o liberación peptida, asociada a la formación de sustancias biológicamente activas, por lo que en modo alguno representa un proceso catabólico.

El LTA4 además de ser hidrolizado por la LTA4 hidrolasa y la LTC4 sintetasa, se puede metabolizar por las lipooxigenasas plaquetarias, la 12 y 15-lipooxigenasa, para formar compuestos biológicamente activos, los trihidroxi-tetraenos o lipoxinas. Hay varias lipoxinas, la A y la B capaces de provocar dilatación arteriolar y además tienen actividad quimiotáctica, favorecen la formación de radicales libres y estimulan a las células NK.

Los leucotrienos sulfidopéptidos son rápidamente inactivados por los polinucleares humanos, inactivación que se realiza en el territorio extracelular tras la liberación de mieloperoxidasas, la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la formación de hipoclorito (HOCl) a partir del ión clorhídrico.

Existen receptores específicos en la superficie celular para el LTB4, especialmente caracterizados en los polinucleares. La unión LTB4 receptor es muy fuerte habiéndose demostrado un proceso de saturación. Se considera que el número de receptores específicos por célula es de 26.000 a 40.000, pudiendo llegar en algunos casos a 386.000. El LTC4 y el LTB4 tienen acción espasmogénica sobre el músculo liso no vascular, actividad dependiente de la región omega hidrofóbica de la molécula.

Se ha señalado que hay heterogeneidad entre los receptores de los leucotrienos sulfidopéptidos, ya que hay diferencia en la respuesta según la concentración del LTC4/LTD4/LTE4. Tal vez haya un receptor de acción. También se ha reconocido la existencia de recep-

tores de alta afinidad, los llamados LT-R1, y de baja afinidad, los receptores LT-R2. Los de alta afinidad reaccionan frente al LTB<sub>4</sub>, mientras que los de baja afinidad lo hacen frente al LTC<sub>4</sub>, los primeros serían inhibidos por la acción del compuesto FPL55712 y los segundos por los bloqueadores de los canales del calcio, como es el diltiacen.

El LTB<sub>4</sub> tiene una importante actividad proinflamatoria. Provoca quimiotaxis, quimiocinesis, agregación y degranulación de los neutrófilos, así como la adhesión de los mismos a las células endoteliales, lo que puede ser considerado como el primer paso de la inflamación. La infusión o inyección intradérmica de LTB<sub>4</sub> produce fundamentalmente un acúmulo de leucocitos polinucleares previa marginación de los mismos en los capilares y adhesión de los mismos a las células endoteliales. El LTB<sub>4</sub> produce también atrapamiento de monocitos, ejerce un efecto supresor sobre la actividad de los linfocitos T y, por el contrario, incrementa la producción de IgG por los linfocitos B. El LTB<sub>4</sub> puede iniciar, ampliar y mantener la inflamación ya que se une a la zona de transcripción del receptor regulador del camino oxidativo de los ácidos grasos. Dependiendo de la intensidad y del tiempo de duración de esta unión, será más o menos intensa la respuesta inflamatoria y en especial su duración (54).

La amplificación de la actividad inflamatoria del LTA<sub>4</sub> desde su lugar de origen es una realidad. Por esto resulta muy interesante volver a señalar que el —LTA<sub>4</sub>—, formado en los monocitos-macrófagos y polimorfonucleares, sufre un proceso de «exportación» y, saliendo al territorio extracelular, penetra en las células endoteliales, en las plaquetas y en los eritrocitos. Posteriormente en las células endoteliales, que carecen de lipooxigenasa por acción de la hidrolasa pasa a LTB<sub>4</sub>, y por la acción del LTC<sub>4</sub> sintetasa pasa a LTC<sub>4</sub>, posteriormente estos dos leucotrienos salen al exterior de la célula.

Mediante estudios farmacológicos en el hombre se ha demostrado el potente poder inflamatorio de los leucotrienos sulfidopépticos. Células humanas en cultivo son capaces de producir estos leucotrienos sulfidopépticos en respuesta a varios agonistas o estímulos inflamatorios. Adelantaré que en la clínica humana se ha encontrado valores elevados de estos leucotrienos en líquidos y exudados.

La infusión de los sulfidopéptidos leucotrienos produce un aumento de las resistencias periféricas, de la resistencia coronaria, de la resistencia renovascular, al mismo tiempo que se produce un incremento importante de la permeabilidad venular, lo que condiciona una disminución del volumen cardíaco/minuto, disminución del flujo renal sanguíneo, reducción del filtrado glomerular.

El LTC<sub>4</sub> y el LTD<sub>4</sub> producen broncoconstricción tanto cuando se administran por vía intravenosa como cuando se administran por vía de aerosol. Esta constricción bronquiolar es más manifiesta en los territorios más periféricos. Además de la acción sobre los músculos lisos bronquiales hay una acción sobre la microvascularización y sobre las células secretoras de moco. En el esputo de los enfermos asmáticos y de los enfermos con fibrosis quística pancreática, así como en el líquido del lavado bronquial de los mismos, en especial niños, se ha encontrado elevada la concentración de leucotrienos sulfidopépticos. Los leucotrienos LTC<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub> tienen también una acción vasoconstrictora sobre las arteriolas, tanto el LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> favorecen la permeabilidad vascular y con ello el edema. Por esta acción se ha señalado una reducción del volumen cardíaco, del flujo sanguíneo renal así como de la filtración glomerular.

La inyección intradérmica de LTB<sub>4</sub> aumenta el poder adherencial de los neutrófilos a las células endoteliales, lo que justifica el que en áreas de inflamación exista un incremento de la adherencia de los neutrófilos a las paredes venulares. Junto a estas acciones vasoactivas, broncoconstrictoras y proinflamatorias de los leucotrienos, el hecho demostrado de que en los lugares donde hay inflamación hay elevación de los leucotrienos, justifica la búsqueda de fármacos, moléculas, capaces de reducir y/o bloquear la producción de leucotrienos, máxime cuando se conoce la eficacia terapéutica de los antiinflamatorios no esteroideos que tienen una acción modificadora de una de las dos rutas mayores oxidativas del ácido araquidónico, la de la ciclooxigenasa-COX.

El papel de los leucotrienos en la inflamación es un hecho comprobado. Se ha podido caracterizar el LTB<sub>4</sub> en el contenido rectal de los enfermos con Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica, en la sinovial de los enfermos con poliartritis crónica progresiva, en las lesiones de psoriasis y en las secreciones nasales de la rinitis alérgica.

gica. Los leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> estimulan la musculatura bronquial produciendo broncoconstricción y también incremento de la secreción mucoosa. Se encuentran en el suero y en la orina de los enfermos asmáticos como después veremos (55). La importancia de los leucotrienos en la enfermedad asmática ha conducido a diseñar y utilizar fármacos anti LTB en el tratamiento del mismo (56).

En los casos en los que la inflamación está mediada fundamentalmente por leucotrienos, existe falta de respuesta terapéutica a la administración de antiinflamatorios no esteroideos —AINES— ya que éstos actúan preferencialmente frente a la ciclooxigenasa. Este hecho obliga a buscar otras vías terapéuticas.

Las vías terapéuticas para frenar la acción inflamatoria de los leucotrienos se ha orientado por tres caminos, 1) hacia la inhibición de enzimas específicas en la síntesis de los mismos, 2) la obtención de antagonistas químicos de los receptores y 3) la administración diaria de substratos alternativos para que no se produzcan los leucotrienos activos.

Se han obtenido varios inhibidores de enzimas del camino oxidativo iniciado por la 5-lipooxigenasa.

El primer inhibidor específico de la cascada de la lipooxigenasa fue la dietilcarbamacina, que en la cavidad peritoneal de ratas a las que se había inyectado suero hiperinmune impedía la generación de la llamada SRS-A. Se demostró posteriormente que la dietilcarbamacina inhibía el paso del 5-HPETE a LTA<sub>4</sub>. También se ha caracterizado una serie de antioxidantes como el BW755C y al ácido nordihidroguayaretico con acción inhibidora de la 5-lipooxigenasa, un derivado tetratilénico del ácido araquidónico. El ácido 5,6-dihidroaraquidónico es inhibidor de la 5-lipooxigenasa. El paso de la LTA<sub>4</sub> a LTC<sub>4</sub> que determina el glutathion-S-transferasa es inhibido por un análogo de la prostaciclina, la 6,9-depoxi-6,9-fenillimino prostaglandina, también denominada U-60,257.

El segundo mecanismo es dotar a las células, en su membrana, de substratos alternativos para la acción de la 5 lipooxigenasa capaces de producir sustancias que no tengan acción proinflamatoria. El ácido eicosapentaenoico incorporado a los lípidos de la membrana es un substrato malo para la lipooxigenasa y puede también inhibir la gene-

ración de productos procedentes del ácido araquidónico, como se ha visto en las membranas plaquetarias y en la de las células sinoviales.

Células cebadas, procedentes del mastocitoma murino, alimentado con ácido eicosapentaenoico genera LTB<sub>4</sub> y LTB<sub>5</sub>, éste es el ácido 5,12-dihidroxi-6,8,10,14,17-eicosapentaenoico que tiene una potencia infinitamente menor que el LTB<sub>4</sub>, tanto como factor quimiotáctico como agregador de los polimorfonucleares, lo que justifica una importante reducción del potencial inflamatorio.

El tercer camino importante para inhibir la acción proinflamatoria de los leucotrienos, concretamente del LTB<sub>4</sub>, es la de inhibir a sus receptores celulares. El FPL55712 se ha demostrado que tiene esa acción al bloquear los receptores concretamente LT-R<sub>1</sub>.(56).

### **FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS (PAF)**

El factor activador de las plaquetas o PAF se describió y fue aislado en la década de 1980. Su descubrimiento representó un avance muy importante en el estudio de las moléculas responsables de la inflamación.

El PAF está producido por basófilos estimulados por antígeno-anticuerpo tipo IgE, por neutrófilos, por eosinófilos, por macrófagos y por células endoteliales activadas (57). El PAF tiene actividad agregante de las plaquetas a las que activa, estimula también a los neutrófilos, a los eosinófilos, incrementa la permeabilidad vascular, genera hipotensión, broncoconstricción, aumento de la contractilidad de la musculatura lisa y produce edema e inflamación.

El papel de este factor es tan importante que, como señala Zimmerman, debería llamarse Factor de Activación de los Neutrófilos, denominación que, como se sabe está reservada para la Interleucina-8 -IL-8. El PAF es un derivado del ácido araquidónico —AA— liberado de los fosfolípidos de la membrana por acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y de la acetiltransferasa.

Pronto se vio que el PAF producía aumento de la microvasculización del árbol traqueobronquial y en especial aumento de la salida de plasma desde el interior de los vasos, siendo capaz de



producir broncoconstricción. El PAF genera un estado de hiperreactividad bronquial, activa a los neutrófilos, a los eosinófilos, a las células endoteliales y es un potente quimiotáctico para los eosinófilos. El PAF es catabolizado por la acción de una acetil-hidrolasa, efecto que se produce rapidísimamente, por eso una situación posible es aquella en la cual la acetil-hidrolasa se encuentre proporcionalmente baja en cantidad o en actividad lo que favorece la potente acción inflamatoria del PAF de producción endógena.

El factor de activación de las plaquetas, el 1-o-alkil-2acetil-sn-glicero-3fosfocálcico, que es un fosfolípido activo que tiene poderosas acciones biológicas, necesita estar dentro de un estrecho límite de seguridad, ya que valores elevados del mismo resultan lesivos para el organismo al potenciar la aparición de procesos inflamatorios. En situaciones patológicas los estímulos proinflamatorios son los que desencadenan incremento del PAF, pero cuando el estado de actividad proinflamatoria no está presente, el incremento del PAF se debe en ciertas ocasiones a la reducción de su catabolismo. Normalmente el catabolismo del PAF lo realiza una enzima «acetil hidrolasa» que hidroliza la molécula a liso-PAF y acetato. Se trata de una fosfolipasa A2 activa frente a fosfolípidos que contienen una cadena corta y oxidada en la posición sn-2 del glicerol (58).

Experimentalmente se ha demostrado que esta enzima inhibe los efectos inflamatorios del PAF. Se ha señalado que la PAF hidrolasa puede estar reducida en el LES, en enfermos asmáticos y en el shock bacteriano. En el Japón se ha descrito la presencia en la población del déficit de PAF-hidrolasa como consecuencia de una transmisión autosómica recesiva, en un 4% d los individuos. Los individuos que sufren este defecto padecen asma y los niveles de la enzima en sangre pueden ser indetectables.

El gen de la enzima PAF-hidrolasa está en el cromosoma 6p12-21.1, lugar compartido por el gen del riñón poliquistico, la epilepsia juvenil mioclónica y en algunos individuos predispuestos a la esquizofrenia. Se ha caracterizado, como responsable del déficit funcional hereditario de la enzima, una mutación puntual que determina en la proteína la sustitución de la valina 279 por la fenilalanina.

Las células endoteliales sintetizan el PAF después de ser activadas por la trombina y la histamina. Se expresa en la superficie de las

mismas pudiendo desarrollar su potencial inflamatorio desde la propia superficie celular (59). Sobre el PAF se fijan los leucocitos circulantes por intermedio de su receptor. La unión de los leucocitos al PAF por intermedio de su receptor es realmente una señal de activación que pone en marcha todos los potenciales inflamatorios del leucocito. Solo los polimorfonucleares bien diferenciados tienen receptor del PAF. La unión del PAF con el receptor es calcio-dependiente, disminuyendo su afinidad cuando se reduce el calcio, el magnesio y el potasio. Esta unión desencadena la activación del leucocito y la aparición en su superficie de las moléculas de adhesión. Es imprescindible la aparición de este receptor para que el leucocito pueda ser estimulado por el PAF, como lo prueba el que la aplicación previa a los leucocitos de un antagonista del receptor, inhibe por completo la activación desencadenada por el PAF. Cada polinuclear granulocítico tiene de 1000 a 12.000 receptores de alta afinidad. Realmente el PAF modifica la capacidad adhesiva del polimorfonuclear al cambiar la regulación funcional de las proteínas adhesivas la CD11a/CD18 ( $\alpha$ L/ $\beta$ 2-integrina, LFA1) y la CD11b/CD18 ( $\alpha$ M/ $\beta$ 2-integrina; MAC-1; MO-1). La CD11b/CD18 favorece la agregación de los leucocitos y su adhesión a la matriz subendotelial, así como a otras proteínas purificadas de la matriz, efecto que se produce de una manera muy rápida a concentraciones mínimas, nanomolares e incluso subnanomolares de PAF. El PAF estimula la exocitosis de los gránulos secundarios de los granulocitos que contienen las moléculas de adhesión, pudiendo ampliarse el potencial de adhesión cuando se une a células endoteliales activadas por la IL-1. El PAF en el plasma se destruye rápidamente por acción de la acetilhidrolasa.

El PAF además favorece la quimiotaxis de los leucocitos, estimula la degranulación de los mismos, la generación de radicales oxidativos, así como la liberación de enzimas lisosomales. La concentración de PAF para producir esta liberación enzimática es mayor que la que se requiere para la respuesta adhesiva. La liberación del contenido de los gránulos se potencia por la presencia del ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico y del leucotrieno B<sub>4</sub> —LTB<sub>4</sub>—. Favorece la liberación de LTD<sub>4</sub> por los neutrófilos. También a concentraciones molares el PAF estimula la liberación de gelatinasa. En otra línea de actuación el PAF desencadena la liberación de ácido araquidónico,

de LTB<sub>4</sub> y de otros productos derivados de la acción de la lipooxigenasa, estimulando, al mismo tiempo, la propia síntesis de PAF por los leucocitos. El PAF además estimula la formación de óxido nítrico, pudiendo unirse a otras células del organismo, como monocitos periféricos, confiriéndoles mayor poder de adhesión. Es un potente quimiotáctico para los eosinófilos a los que activa, favoreciendo su capacidad sintética. En determinadas condiciones el PAF es internalizado y metabolizado por las células endoteliales favoreciendo la producción del Factor de Crecimiento Plaquetario —PGGF— con la consiguiente estimulación de las células musculares lisas. Finalmente se ha señalado que la aceleración de la reabsorción ósea, en los procesos inflamatorios, puede ser desencadenada por la acción del PAF al fijarse sobre los receptores de los osteoclastos.

Como consideración final, sobre la importancia del PAF en la inflamación, diremos que los leucocitos estimulados por el PAF tienen una mayor capacidad de adhesión sobre las células endoteliales. Actuando sobre los monocitos-macrófagos provoca agregación y mayor capacidad para la fagocitosis dependiente del complemento, favorece la producción de TNF, estimula la producción de citoquinas en respuesta a los lipopolisacáridos, incrementa la síntesis de leucotrienos y aumenta considerablemente su poder de adhesión a las células endoteliales. Por otro lado potencia la producción de radicales libres por los mismos. Actuando sobre las células basófilas aumenta su poder de adhesión a las células endoteliales y sobre las células eosinófilas aumenta la quimiotaxis, la adhesión a los endotelios, su degranulación y la formación de radicales libres, así como la capacidad de unirse a la inmunoglobulina IgE.

Modelos experimentales de shock secundario a endotoxinas, con alteración importante del pulmón, corazón, estómago, intestino, riñones, se ha visto que éste está mediado por el PAF y potenciada por el TNF $\alpha$ , ya que se puede impedir el shock por acción de anticuerpos frente al receptor del PAF.

El PAF se libera en el árbol respiratorio en los enfermos asmáticos, este hecho junto a las propiedades de acción del PAF ha conducido a la investigación de moléculas capaces de inhibir su acción. Se han obtenido moléculas antiPAF, especialmente moléculas anti-receptores del PAF. Los primeros ensayos se realizaron con el Mo-

dipafan o WEB2086 siendo los resultados poco satisfactorios en los casos moderados y leves de asma. Se pensó que esta pobre respuesta se debiese a la utilización de dosis inadecuadas, por eso un grupo de autores japoneses realizaron la misma experiencia pero con dosis mayores de WEB2089. El resultado fue más satisfactorio obteniéndose un claro beneficio en enfermos afectos de asma.

Los trabajos realizados en nuestro País, por Rodriguez-Roisin y colaboradores, ponen de manifiesto que el PAF produce una reducción de la PO<sub>2</sub> y una reducción mayor de la diferencia arterio-alveolar de PO<sub>2</sub> lo que indica un trastorno mayor que la simple alteración de la ventilación perfusión. La reducción de la PO<sub>2</sub>, relación alveolo-capilar, es igual que la que se produce en las situaciones de asma severo. Posiblemente este efecto se deba a la generación de exudado en el territorio microvascular del árbol respiratorio que produce el PAF.

Se ha señalado que el PAF es capaz de producir mayor cantidad de leucotrienos, es decir de estimular mas la actividad de la 5-lipooxigenasa, en los granulocitos de los enfermos asmáticos.

Los trabajos de K. Shindo, en Yokohama, señalan que los neutrófilos de enfermos asmáticos producen mayor cantidad de leucotrienos B<sub>4</sub> cuando son activados por el PAF.

No obstante este hecho no ha sido totalmente confirmado, lo que sí parece cierto y confirmado es que granulocitos de asmáticos previamente activados por el factor de crecimiento de colonias granulocítico-monocítico —el GM-CSF—, responden más activamente al PAF y generan mas 5-lipooxigenasa. Es pues una cascada de efectos multiplicativos lo que probablemente sea el responsable final de respuestas inflamatorias de gran actividad. En relación a la histamina, se ha señalado que el tratamiento previo de los granulocitos basófilos con GM-CSF, potencia la liberación, por acción de la IgE, de la LTC<sub>4</sub>, así como también de la histamina. El PAF es capaz de activar a los eosinófilos de enfermos asmáticos con la producción mayor de LTC<sub>4</sub>.

El PAF puede actuar como un potenciador o multiplicador de la respuesta inflamatoria en determinadas zonas del organismo y concretamente en la reacción asmática, porque como se ha señalado

anteriormente se encuentra elevado los niveles de PAF y de lisoPAF en los lavados broncoalveolares de los enfermos asmáticos.

## INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD

Sólo citaré unos pocos ejemplos:

### ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La enfermedad inflamatoria intestinal —enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa— representa un ejemplo claro de patología en la que la inflamación juega un papel de gran magnitud.

Los comentarios que haré sobre el asma bronquial y la osteoporosis, los expondré indicando al mismo tiempo planteamientos terapéuticos futuros.

Está perfectamente demostrado que la expresión del mRNA del COX-2 juega un papel muy importante y significativo en la respuesta inflamatoria de la enfermedad inflamatoria intestinal, tanto de la colitis ulcerosa como de la enfermedad de Crohn. La intensidad y cantidad, medida con escala semicuantitativa de la lesión inflamatoria, demostrada por biopsia, guarda paralelismo con la intensidad en la expresión del mRNA del COX-2. El mRNA del COX-1 sin embargo no guarda relación con la intensidad de la inflamación (60).

En los enfermos con «enfermedad inflamatoria intestinal» hay elevación de la IL-1 y del TNF $\alpha$  en los macrófagos de la sangre periférica así como en las células monocíticas que están en la mucosa intestinal. El TNF en el lavado del colon en estos enfermos está elevado. Curiosamente la administración de IL-10 frena la producción de IL-1 y de TNF- $\alpha$  en los mononucleares de estos enfermos, por esto es importante señalar que la supresión de la formación de IL-10, en la mucosa intestinal, potencia la respuesta inmunoinflamatoria en la mucosa intestinal (61).

La aplicación tópica de la IL-10 sobre la mucosa del colon inflamado produce una disminución considerable de la formación de IL-1b y de TNF $\alpha$ , reduciéndose la inflamación. Parece lógico pensar que la administración sistémica o tópica de IL-10 puede desarrollar

efectos curativos muy importantes en la inflamación, en especial en la enfermedad inflamatoria intestinal. Frente a esta afirmación sorprende que la valoración del TNF en el lavado de colon en enfermos con enfermedad inflamatoria no sirve para conocer el grado de enfermedad o de agresión de la misma sobre el intestino. Por otro lado se ha visto que la asociación terapéutica, al menos in vitro, de IL-10 sobre monocitos de enfermos y de controles asociada a IL-4 y de IL-10 asociada a IL-13 inhibe la formación de IL-1 y de TNF (62)(63).

La importancia de los leucocitos en la inflamación es muy importante. Sirva como ejemplo el efecto beneficioso de la sustracción —leucoféresis— de leucocitos en la intensidad de la inflamación de la colitis ulcerosa. En Japón, en el Hyogo College of Medicine en Nishinomiya, han demostrado que la leucoféresis realizada al ritmo de una semanal, durante cinco semanas consecutivas, seguidas de 1 mensual, durante cinco meses, como terapia de mantenimiento, produjo una respuesta excelente o satisfactoria en 20 de 25 casos, lo que representa un 80% durante esta terapia intensiva. Paralelamente también se redujo la proteína C reactiva y la velocidad de eritrosedimentación, que son marcadores de la inflamación. La relación posible que puede tener la base genética en la respuesta inflamatoria, queda reflejada aquí en el hecho de que la mejoría se produjo en aquellos enfermos que tenían elevada la presencia de los antígenos HLADR+, HLADR+CD3+, HLADR+CD8+.

## ASMA

En los individuos predispuestos, el esfuerzo físico puede ser un factor precipitante de la reacción asmática. Después del esfuerzo físico hay hiperosmolaridad que puede condicionar posteriormente una broncoconstricción al liberarse, por estímulo sobre la mucosa bronquial, histamina. Además se ha visto que los leucotrienos sulfidopépticos tienen un papel muy importante en estas crisis asmáticas, habiéndose encontrado en orina niveles elevados de leucotrieno E4 (64). Este hecho ya había sido señalado en otras situaciones asmáticas desencadenadas por alérgenos. La preparación de la crisis asmática con un antagonista del receptor LTD4 disminuye considerablemente la broncoconstricción tras el esfuerzo.

El LTE-4 se elimina en la orina durante un periodo de 6-7 horas después de la infusión o de la inhalación de LTC4 y LTD4, por esto la determinación de LTE4 en orina puede representar realmente la producción de LTC4 y de LTD4 (65). Recordemos que el leucotrieno E4 —LTE4— es más estable.

Un preparado de síntesis que inhibe los receptores LTD4 y LTE4 ha demostrado tener utilidad en el asma y mejora la calidad funcional respiratoria, sin embargo los efectos secundarios de faringitis, rinitis e incluso la aparición de un cuadro clínico similar a la vasculitis de Churg-Strauss, ha hecho que por el momento su eficacia no esta reconocida y requiere todavía más investigación (66). La dosis de 20 mg tres veces al día tal vez sería la aconsejada tal como se ha visto en los ensayos realizados durante trece semanas. Dosis mayores de 40 dos veces al día, son peligrosas por los efectos secundarios.

La aplicación por vía oral del compuesto Web2086, produce una reducción mantenida del PAF, como se demuestra claramente por la inhibición de la agregación plaquetaria. Una dosis oral de 40 mg puede prevenir la inducción de la broncoconstricción desencadenada por la inhalación de PAF. Curiosamente en un estudio randomizado, se vio que la administración de 40 mg del Web 2086 tres veces al día, durante doce semanas, no produjo efecto beneficioso en un grupo de enfermos asmáticos y tampoco logró una reducción significativa de las necesidades de administración de corticoides inhalados (67).

## OSTEOPOROSIS

Comentaré algunos hechos que parece relacionar inflamación y osteoporosis.

Se ha estudiado mucho la intervención de las citoquinas proinflamatorias en el complejo proceso de la reabsorción ósea, relacionándose en cierta medida a la inflamación y a la osteoporosis. En este sentido no debemos olvidar que el osteoclasto es de estirpe macrofágica y estas células, los macrófagos, tienen un papel central en la inflamación.

La interleucina 6 —IL-6— que tiene varias denominaciones, como BSF-2, proteína 26 Kd, interferón  $\beta_2$ , factor de crecimiento del hibridoma-plasmocitoma y factor estimulante de los hepatocitos, tiene una acción múltiple sobre el hueso.

La IL-6 está elevada en el líquido sinovial de los enfermos con artritis reumatoide y otras artritis (68). La IL-6 es un mediador de la acción de la interleucina 1 sobre el hueso, que es un factor activo en la reabsorción ósea. Se ha señalado que los osteoblastos producen IL-6 y que la hormona paratiroidea estimula la producción de esta citoquina. También se ha visto que la IL-1, el TNF y los lipopolisacáridos incrementan la expresión de mRNA de la IL-6 en los osteoblastos. Parece demostrado por diferentes trabajos que la IL-6 es indudablemente producida por los osteoblastos, no está claro si esta propia IL-6 actúa sobre las mismas células de manera autocrina, como se ha señalado con la fosfatasa alcalina, osteocalcina o las prostaglandinas de los osteoblastos. Por el contrario la IL-6 estimula la formación de osteoclastos como se ve por el incremento en el número de células multinucleadas que reaccionan al anticuerpo monoclonal 23c6, que es específico del receptor de la vitronectina del osteoclasto. Esta acción es inhibida por la calcitonina. Por el contrario los receptores de la vitronectina aumentan cuando la administración de IL-6 se asocia a la administración de 1,25 dihidroxi vitamina D3.

En estudios sobre tumores osteoclásticos humanos, se ha visto como las células gigantes tienen receptores para la IL-6 y que la administración de IL-6 estimula la reabsorción ósea. Los enfermos con enfermedad de Paget tienen cifras elevadas de IL-6, hecho que se ha visto con claridad en el plasma medular de enfermos afectados de Paget.

Puede ser que la acción antiosteoclástica de los estrógenos se realice a través de una inhibición de la IL-6. En este sentido Girasole ha demostrado que la administración de  $17\beta$ -estradiol inhibe la formación de IL-6 por los osteoclastos estimulados por TNF. Tal vez la acción sobre la reabsorción ósea de la IL-6 se deba fundamentalmente a estimular la formación de osteoclastos más que a activar su función, pero posiblemente esta dualidad o no de acción se deba fundamentalmente a su concentración. Los factores osteotrópicos



como la PTH, la IL-1 y el 1,25-dehidroxicolecalciferol estimulan la formación de IL-6 a partir de los osteoblastos. Esta IL-6 en concentraciones pequeñas, inferiores a 10 ng/cc, estimula simplemente la formación de osteoclastos mientras que a concentraciones mayores, 10 ng/cc es capaz de estimular a los osteoclastos y producir la reabsorción ósea.

Es un hecho conocido que en la artritis reumatoide hay destrucción del hueso periarticular. Está provocada por actividades proinflamatorias como IL-1, el Factor de Necrosis Tumoral —TNF—, la IL-6, y el Factor Inhibidor Leucémico —LIF—. Estas moléculas se han caracterizado como factores activadores de los osteoclastos, que son responsables de la reabsorción «in vitro» e «in vivo» del hueso. La IL-4 por el contrario se ha mostrado opuesta a la reabsorción ósea y produce un freno o inhibición en la actividad osteoclástica provocada por la IL-6 y por el LIF (69).

Estudios histomorfométricos realizados en muestras de hueso extraído de zonas yuxtoarticulares durante la cirugía han demostrado incremento del 35% del área total del hueso, después de la administración de IL-4. Todavía es más interesante que con la administración de IL-4 no se pudo detectar la presencia de osteoclastos en los cortes de hueso.

Si en la reabsorción ósea en los procesos inflamatorios articulares está mediada por la aparición de prostaglandinas, ¿será posible inhibir esta reabsorción ósea mediante el uso de antiinflamatorios no esteroideos? Estudios realizados en modelos experimentales en animales y en mujeres postmenopausicas han demostrado que la toma continua de aspirina, después de un periodo de cuatro años, eleva la densidad mineral ósea del 2,3 a 5,8%. No obstante el riesgo de fractura no se modificó (70).

Los péptidos leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, así como el 5-HTE, que es el ácido 5-hidroxiperoxicicosatetraenoico induce la reabsorción ósea vía osteoclástica. Se ha señalado la presencia de receptores de LTD<sub>4</sub> en las células tipo osteoclasto. El LTB<sub>4</sub> también aumenta la reabsorción ósea «in vivo» después de su administración local. En cultivos de células de la médula se ha demostrado que la producción de LTB<sub>4</sub> desencadena un incremento de la reabsorción ósea previa aparición de osteoclastos (71).

La asociación de la IL-6 y de su receptor soluble en el líquido sinovial guardan paralelismo con el grado de destrucción ósea bajo la zona cartilaginosa por la formación de osteoclastos (72).

No se sabe con exactitud el papel que puede tener el NO en la remodelación ósea. Este tiene una curva bifásica sobre la reabsorción después de su inducción por citoquinas (73).

¿Qué papel juega el NO en la inflamación y más concretamente en la reabsorción ósea?

Esta pregunta no está exenta de fundamento ya que la sintasa del NO inducible, es activada por las citoquinas que se encuentran elevadas en los enfermos con artritis reumatoide, citoquinas que se considera tienen en cierta medida influencia sobre la reabsorción ósea. Por otro lado se sabe que la IL-1, el TNF, el INF $\gamma$  y la endotoxina estimulan la formación de NO actuando sobre los macrófagos, linfocitos, células mesangiales, hepatocitos y condrocitos (74).  
**¿SERA POSIBLE MODULAR E INCLUSO INHIBIR LA RESPUESTA INFLAMATORIA BLOQUEANDO LA FORMACIÓN DE NO?**

## INTERLEUCINAS Y ENFERMEDAD

Es evidente el papel que juegan las citoquinas en la producción, mantenimiento y evolución de los procesos inflamatorios. En algunas enfermedades se ha descrito «patrones de citoquinas» que facilitan el diagnóstico, como se ha señalado recientemente en la colitis ulcerosa y en la enfermedad de Crohn. En la colitis ulcerosa se encuentra aumentada la IL-4, la IL-5 y en ocasiones, durante la evolución, la IL-10 (75). En el Crohn está aumentada la IL-2, el interferón- $\gamma$  y el TNF $\alpha$ . Esto indica que existe realmente lo que se ha llamado «perfil de citoquinas» o «cascada de las citoquinas» ya que hay citoquinas que asociadas potencian su acción, hay un sinergismo entre ellas, mientras que otras desarrollan una acción opuesta, inhibitoria. Esta realidad permite no solo conocer el mecanismo de la inflamación en un caso concreto sino también abrir caminos terapéuticos incidiendo sobre puntos concretos de la «cascada» a través de moléculas que intercepten a los receptores de estas moléculas o frenen la expresión de los genes que producen estas moléculas.

Según su actividad proinflamatoria o antiinflamatoria en esta cascada de citoquinas, éstas se pueden clasificar en dos grandes grupos. El de las citoquinas tipo I, que tienen actividad proinflamatoria y las del tipo II. En el tipo I se incluyen el  $\text{INF}\gamma$ , la IL-1, la IL-2, la IL-6, la IL-8, el  $\text{TNF } \alpha$  y  $\beta$ . En el tipo II está la IL-10 y en cierta medida la IL-4 y la IL-5.

Se puede demostrar el diferente juego de la diversas citoquinas en diversas enfermedades inflamatorias citando a la «enfermedad inflamatoria intestinal». Los mononucleares de la colitis ulcerosa responden de una manera diferente a la IL4 que lo que hacen los de la enfermedad de Crohn. Es por tanto muy importante el que ya se empiece a conocer los genes que regulan la síntesis o formación de estas citoquinas.

El gen de la IL-10 está en el cromosoma 1, el de la IL-1a en el cromosoma 2q12-21, el de la IL-1b en el cromosoma 2q13-14. El gen de IL-1ra, que es el receptor de la interleucina IL-1 se encuentra también en el mismo lugar. El gen de la IL-8 está en el 4q13-21, el de la IL-2 en el 4q26, el de la IL-3 en el 5q22-31, en este mismo lugar se señala el de la IL-4, así como el de la IL-9. La M-CSF, es decir el factor monocítico formador estimulante de colonias se encuentra en el 5q-33, el  $\text{TNF}\alpha$  en el 6p21.3, en el mismo lugar se señala la  $\text{TNF}\beta$ , la IL-6 en el 7b21, el  $\text{INF}\gamma$  en el 12q. Dentro de estos genes se señala un amplio polimorfismo, en especial en las zonas donde se encuentra la zona promotora del gen.

Por otro lado también se ha localizado los genes donde se encuentran los receptores de las citoquinas, así por ejemplo el IL-6Ra se encuentra en el cromosoma 1q21, el  $\text{TNFR}2$  se encuentra en el 1b36, el IL-8Ra en el 2q35, también se encuentra aquí el IL-8Rb. El IL-5Ra se encuentra en el 3p24-26, el  $\text{INF}\gamma\text{R}1$  se encuentra en el 6q15-21, el IL-2Ra se encuentra en el 10p14-15, el IL-10R se encuentra en el cromosoma 11, el  $\text{TNFR}1$  se encuentra en el 12p13, el IL-5Rb se encuentra en el 22q13.1, el GM-CSFRa está también en este mismo lugar, el IL-2Rb en el 22q11.2-12, el IL-2Rg en el xq13.

No está fuera de lógica afirmar que muchas de las entidades, en las cuales la inflamación juega un papel principalísimo, tengan un trasfondo genético.

## INFLAMACIÓN Y CÁNCER

Ciertos estudios epidemiológicos han permitido afirmar, aún con las dudas que esta afirmación encierra, que el estilo de vida y concretamente determinados factores nutricionales pueden ejercer sobre la aparición de determinados tipos de cáncer, en especial el carcinoma de colon. Frente a estos estudios se señala que dietas ricas en carne y en grasa aumentan el riesgo del cáncer colorrectal. Interesantes estudios epidemiológicos han demostrado que cuando la dieta es rica en grasa de procedencia de pescados, el desarrollo del cáncer colorrectal se reduce (76). También se ha señalado, en estudios de manipulación dietética en animales, que ciertas dietas ricas en grasa procedente del maíz tienen poder cancerogénico. El aceite de maíz es rico en ácido omega-6 PUFAs, tal como le corresponde por su contenido en ácido linoleico que tiene 18:2,N-6. Por el contrario, cuando se administra aceites de animales marinos —peces—, que son ricos en omega-3PUFAs como el EPA, que tiene c20:5,n-3, y el DHA que tiene c22:6,n-3, se reduce el cáncer de colon. En este sentido son muy importantes los estudios que demuestran que la respuesta inflamatoria o la actividad inflamatoria en enfermos con poliartritis crónica progresiva y con psoriasis, se reduce cuando en la dieta hay cantidades importantes de aceite de procedencia de los peces. Esta reducción también se produce en cuanto a la mortalidad por patología cardiovascular. Igualmente también se reducen las lesiones en animales producidas por la endotoxina cuando están alimentados con grasa de procedencia de los peces.

En línea paralela a estos estudios, se señaló hace tiempo que la administración continuada de acetilsalicílico, de piroxican o de sulindac, que son antiinflamatorios no esteroideos, reducían la incidencia de cáncer de colon, así como el número y tamaño de los pólipos del colon incluida la adenomatosis familiar. Estos hechos hicieron pensar en una sobre expresión de la ciclooxigenasa. Estudios posteriores demostraron que había activación del gen de la isoforma COX-2, que fácilmente responde a estímulos mitogénicos y de hormonas estimulantes. Igualmente ocurre con los oncogenes c-Fox y el c-Jun, que tienen un aumento de su expresión.

Se ha comprobado que la inhibición, con antiinflamatorios no esteroideos, de la COX-2 disminuye la incidencia del cáncer de colon

así como de las lesiones premalignas. Experimentalmente se ha podido demostrar que los focos del crecimiento de células aberrantes en las criptas glandulares también desaparecen.

Son muy interesantes los estudios experimentales de modificación de la estructura fosfolipídica de la membrana mediante manejo dietético y su repercusión en la carcinogénesis de colon. Ya es sabido que el ácido omega-3PUFASEPA y el DHA, que se encuentran en la grasa de los peces, ejercen una inhibición de la actividad de la COX-2 modificando el metabolismo del ácido araquidónico. La administración de este ácido determina un cambio en la estructura de los fosfolípidos de las membranas celulares produciéndose una incorporación mayor del Omega-3 frente al Omega-6, lo que condiciona un comportamiento diferente de las membranas así como de las enzimas unidas a la misma capaces de modular, en cierta medida, la sensibilidad a los estímulos carcinogénicos.

Recientes estudios experimentales en ratas demostraron que la inducción de cáncer de colon, tras la alimentación con axocimetano, era frenado si se les alimentaba con grasa procedente de los peces, ricas en ácido omega-3, ya que se inhibía la expresión de la COX-2, hecho que no se producía si se les alimentaba con aceite de maíz.

En el cáncer de colon se ha encontrado que existe un incremento de la mRNA de la COX-2 a niveles del 80-90%. Células epiteliales del intestino del ratón que han sido transfectadas con la COX-2 tienen una sobre expresión de la misma y una resistencia importante a la apoptosis, al tiempo que se aumentan los niveles de Bcl-2.

## **CONTROL FARMACOLÓGICO DE LA INFLAMACIÓN**

Me limitaré en esta parte del discurso a hacer algunos comentarios sobre los esteroides, los antiinflamatorios no esteroideos o AINES y finalmente mencionaré algunos planteamientos terapéuticos que puedan ser en el futuro de interés. No trataré nada de la terapia antihistamínica porque tiene un papel muy secundario en la inflamación.

## LA ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DE LOS ESTEROIDES

La actividad antiinflamatoria de los esteroides en los procesos inflamatorios agudos, y en especial en los crónicos, es la más eficaz de todos los antiinflamatorios que se conocen en la actualidad.

Los glucocorticoides realizan su acción uniéndose a un receptor específico existente en la membrana citoplasmática de las células. Este receptor se encuentra en todas las células del organismo pero su cantidad varía de unos tejidos a otros. Hay un solo tipo de receptor para los glucocorticoides, es decir no hay receptores de alta o baja afinidad, pero los receptores para los mineralocorticoides también pueden fijar a los glucocorticoides. El gen del receptor de glucocorticoides pertenece a una familia de supergenes, incluye a otros receptores citosólicos de moléculas de estructura semejante, como la progesterona, los estrógenos, la hormona tiroidea, el ácido retinoico, la vitamina B. El receptor de los glucocorticoides está fosforilado en la zona aminoterminal, sobre un residuo de serina (77).

En su forma inactiva, sobre la superficie de la célula, el receptor de glucocorticoides, se encuentra unido a un «complejo proteico» de gran tamaño, de unos 300 kDa. Este complejo proteico consta de dos subunidades de la proteína del shock calórico unidas a la porción C-terminal de la molécula del receptor. A este complejo proteico se une también otra proteína, la «inmunofilina 59kDa», así como otras proteínas inhibitorias. Parece ser que el complejo proteico favorece los plegamientos necesarios de la molécula del receptor para impedir que éste, antes de unirse a los glucocorticoides, se desplace al núcleo, que es precisamente donde ejercen su función los esteroides. Después de fijarse el esteroide a su receptor se libera el complejo proteico, permitiendo que el complejo esteroide-receptor se desplace y se una al DNA nuclear.

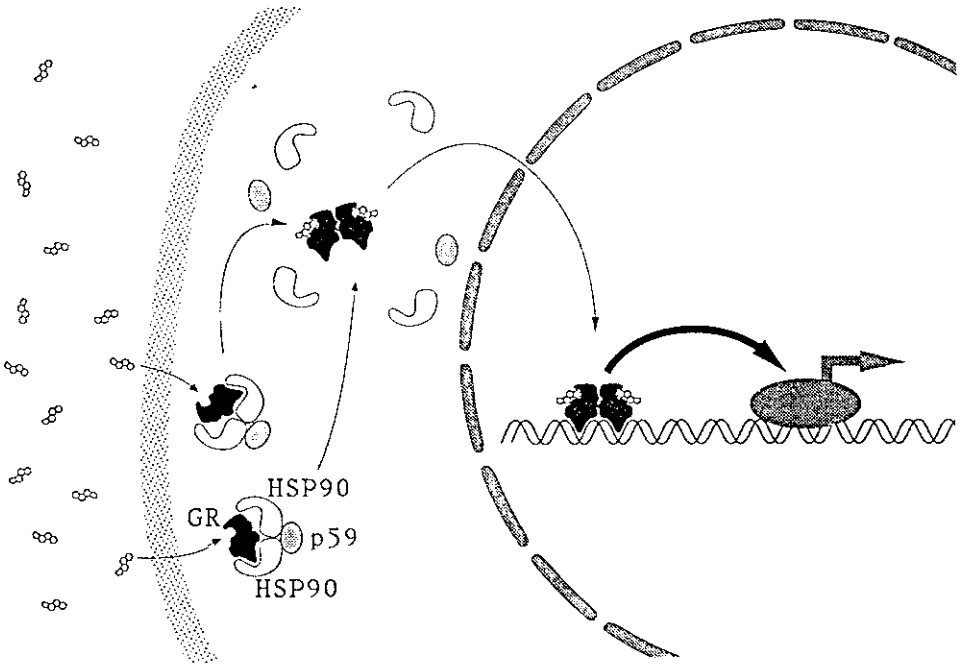
Las Proteínas del Shock Calórico son un grupo de moléculas proteicas que mantienen la integridad celular no solamente de los mamíferos y de otros animales sino también de las bacterias, incluidos los helmintos y los protozoos. Se ha señalado varias proteínas con diversos pesos moleculares que oscilan entre 110 a 8 kDa. Parece ser que la HSP90 es la más abundante y sirve para realizar funciones de ordenamiento y de unión de los filamentos de actina-

miosina. La fracción más pequeña interviene en los procesos de reordenamiento de los cromosomas. Una especial característica es la de tener antigenidad cruzada con proteínas de varios organismos, lo que permite comprender que posibles infecciones bacterianas creen anticuerpos frente a las proteínas del Shock Calórico. Estos anticuerpos, con reacción cruzada, pueden poner en marcha un mecanismo autoinmune. Así en ciertos casos de artritis se ha encontrado anticuerpos IgG frente a ciertas bacterias que actúan también frente a proteínas del estrés calórico de p.m. de 60 kDa. Este anticuerpo se ha encontrado en la fibrosis quística, en la artritis reumatoide, en la esclerodermia y en la glomerulonefritis.

Se ha señalado en enfermos con fibrosis quística que aquellos que tienen elevado el título de IgG contra la proteína HSP27, tienen mayor tendencia a enfermedad severa pulmonar así como a la infección por la *Pseudomona Aeruginosa* y es probablemente que en cierta medida sean responsables de la artritis que se presenta en estas situaciones. Los anticuerpos IgG frente al HSP humano con 27 y 90 kDa puede significar una reacción cruzada frente a antígenos bacterianos. La aparición de estos anticuerpos se debe a un estímulo antigénico producido por los gérmenes que infectan el pulmón como *H.Influenzae*, *Staphilococo Aureus*, *Pseudomona Aeruginosa*.

La fijación del receptor al DNA se realiza por la porción carboxi-terminal del mismo. Es una molécula que contiene, en su zona central, dos proyecciones o «fingers» (dedos) coordinados cada uno por una molécula de zinc, unida a cuatro residuos de cisteína. En la zona aminoterminal se encuentra el territorio responsable de la activación transcripcional de los genes, una vez que el DNA se ha unido al complejo receptor-esteroide. Existe otra segunda zona de transcripción, o dominio de transcripción, próxima al dominio de unión del receptor al DNA. Señalaré que la administración de esteroides reduce el número de receptores en los monocitos y en los linfocitos circulantes, al igual que se produce una reducción del mRNA del receptor en el tejido pulmonar. (Fig. 5).

El complejo «receptor-glucocorticoide» se une al DNA en las zonas llamadas de «respuesta glucocorticoidea» o GREs (elementos E que responden R a glucocorticoides G) del propio DNA, que están en la región donde se localizan los genes que responden a los este-



La hormona glucocorticoidea difunde a través de la membrana celular y se une al complejo receptor-proteína (proteína del shock calórico Hsp90 y P59). Esta unión moviliza al complejo que se disocia posteriormente formándose un dímero de receptor-glucocorticoide que se desplaza al núcleo para unirse a las zonas de DNA receptoras del mismo.

FIG. 5. *Glucocorticoides y su receptor.*

roides. La zona GREs, con respuesta activadora, está representada por una estructura de 15 pares de bases, cuya secuencia es GGTA-CAnnnTGTTCT, mientras que la zona de los GREs inhibidores está constituida por otra secuencia de bases ATYACnnTnTGATCn.

El número de genes diana en las células, directamente regulados por el receptor glucocorticoide no está claramente caracterizado, pero se considera que es grande y puede variar de célula a célula entre 10 a 100 genes (77).

Los esteroides son potentes inhibidores de la transcripción del gen de la colagenasa que, por otro lado, está inducida por el «factor activador proteico-1» —AP-1—. Este es un heterodímero formado



por las proteínas Fos y Jun, que son productos de los protooncogenes c-Fos y c-Jun. El factor de necrosis tumoral-alfa —TNF $\alpha$ — induce la acción del gen de la colagenasa activando al factor activador proteico AP-1 y aumentando su unión al DNA. El TNF activa también la transcripción del NF $\kappa$ B. Estas uniones son inhibidas por los esteroides. Por esto y este mismo mecanismo los esteroides inhiben los efectos de otras citoquinas que producen su acción vía AP-1 como el LTB<sub>4</sub>, el PAF. Los linfocitos T son parcialmente activados por el AP-1, con la consiguiente inducción de diversos genes, como los del receptor del IL-2 y del IL-2. Los esteroides amplían su acción antiinflamatoria frenando la acción de los linfocitos T y su proliferación.

Un hecho que hay que señalar es que la diferente expresión y producción de las diferentes citoquinas es un factor determinante de la naturaleza y del tipo de respuesta inflamatoria. Los esteroides tienen la capacidad de inhibir la transcripción de varias de las citoquinas con importante papel en la inflamación, como son la IL-1, el TNF $\alpha$ , el Factor Estimulador de Colonias Granulocítico-Macrofágico GM-CSF, la IL-3, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-8. Este efecto está mediado por la interacción del receptor de los glucocorticoides con GREs negativos, lo que conduce a una represión del gen de transcripción de las citoquinas (77). El gen de la IL-6 tiene cuatro GRE negativos, por esto es tan sensible a la acción de los esteroides. La citoquina IL-1, IL-3 y el GM-CSF sufren una reducción de su mRNA por acción de los esteroides. También los esteroides pueden realizar su acción antiinflamatoria inhibiendo la síntesis de los receptores de algunas citoquinas, como ocurre con el receptor de la IL2. Esta importantísima acción la desarrolla por intermedio de la lipocortina, proteína de 37 kDa cuya síntesis estimulan los glucocorticoides. La lipocortina tiene un poderoso efecto inhibitor de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, lo que induce a una inhibición de la producción de mediadores lipídicos tales como los leucotrienos, las prostaglandinas y el Factor Activador de las Plaquetas (PAF). Con absoluta claridad se ha comprobado que la inyección de lipocortina recombinante inhibe la liberación de mediadores lipídicos de la inflamación. La síntesis de lipocortina por acción de los esteroides ha sido considerada durante mucho tiempo como el mecanismo más importante de acción antiinflamatoria de los esteroides, no obstante hay algunas dudas sobre ello, ya que en algunas células este proceso no ha podido ser demostrado.

La lipocortina 1 pertenece a una familia de moléculas llamadas anexinas, que son proteínas que se unen a través del calcio a los fosfolípidos y tienen acción antiinflamatoria. No existe lipocortina en todos los tejidos de los mamíferos, se encuentra selectivamente en un grupo de leucocitos circulantes en los que se expresa el mRNA de la lipocortina tras el estímulo de los glucocorticoides. Lo mismo se puede decir de los linfocitos, pero en menor cantidad, no habiendo diferencia entre la CD-4 y la CD-8. Por citometría de flujo se ha podido estudiar la acción de la lipocortina sobre los leucocitos, tema muy importante para investigar. La lipocortina actúa como modulador endógeno de la inflamación por esto se considera que juega un papel muy importante en la inflamación sinovial de la artritis reumatoide.

La lipocortina 1 interviene también en el bucle del «feed-back» negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis. La lipocortina actúa frenando la producción de radicales de oxígeno, la proliferación de los linfocitos, la síntesis de prostaglandinas y la producción de óxido nítrico. Frena el edema producido por la fosfolipasa 2, frena la migración de los leucocitos producidos por citoquina, frena la acción febril producida por la citoquina. En los animales adrenalectomizados, la cantidad de lipocortina 1 se encuentra reducida en los leucocitos periféricos, en especial después de desencadenarles una artritis similar a la reumatoide. Es especialmente interesante que el tratamiento con antilipocortina, concretamente antilipocortina 1 —Mab— produce una exacerbación del cuadro de sinovitis experimental.

En condiciones normales y basales, existe un nivel medio de lipocortina que está regulada por la secreción endógena de glucocorticoides, como puede verse valorando la cuantía de lipocortina en los granulocitos circulantes. Se ha visto que la reducción en la producción de esteroides lleva a la reducción de lipocortina y esto puede desencadenar un brote de actividad de la artritis reumatoide (78).

Curiosamente en un grupo de enfermos con artritis reumatoide se ha señalado una resistencia a la lipocortina, estando reducida la respuesta. También se ha señalado la presencia de autoanticuerpos frente a la lipocortina y se correlaciona con la resistencia a los esteroides de algunos enfermos con AR. También se ha señalado una

reducción en el número de receptores en las células monocíticas y neutrófilos a la lipocortina.

Además de la inhibición de la transcripción del gen de la fosfolipasa A2 citosólica, que está inducida por citoquinas, los esteroides inhiben también la expresión del gen de la ciclooxigenasa 2 — COX.2— en los monocitos, cuya inducción es vía citoquinas. No se sabe si también modulan la expresión de la 5-lipooxigenasa. Se sabe que el LTB4 y el PAF inducen la expresión de c-Fox y de c-Jun y activan la fijación del AP-1 a células inflamatorias. Estos tres procesos o actividades pueden ser inhibidas por los esteroides. En los macrófagos la sintasa del óxido nítrico es inhibida por los esteroides. Parece indudable que el NO juega un papel activo en la inflamación, sirva de ejemplo decir que el NO aumenta el flujo en el árbol bronquial y favorece la exudación.

Otra acción de interés que desarrollan los esteroides es el incremento de la transcripción de los genes  $\beta$ 2-adrenoreceptores, que tienen 3 GEREs en la secuencia de promoción. El incremento de esta transcripción requiere sin embargo una alta concentración de esteroides. Los esteroides disminuyen la transcripción del gen que codifica al receptor de la taquinina NK1, que es un factor mediador de la inflamación producida por la sustancia P. Señalaré que la NK1 tiene una expresión aumentada en el asma y en la enfermedad inflamatoria intestinal.

También los esteroides tienen una acción inhibitoria directa sobre la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y E-selectina. Conviene señalar que la leucocitosis producida por los esteroides se debe, en parte, a una disminución de su marginación al reducir la capacidad de adhesión de los mismos a las células endoteliales. Se ha demostrado que los esteroides reducen la expresión de la selectina E (CD-64) y la molécula de adhesión ICAM-1 (CD-54), lo que reduce la capacidad de unión del polimorfonuclear a la célula endotelial. Por otro lado los esteroides reducen el proceso de emigración celular.

La linfopenia que producen los esteroides se deben fundamentalmente a una redistribución de los mismos, fundamentalmente en la médula ósea y no a una linfolesis, pudiendo esto deberse a una dificultad de la recirculación de los mismos al impedir su reentrada

en la circulación. Se sabe que los esteroides frenan o impiden la linfocitosis secundaria al esfuerzo físico y no se sabe si esto es por un freno en la adhesión de los linfocitos, ya que se ha demostrado que las moléculas de adhesión a las células endoteliales y a los fibroblastos están reducidas. Los esteroides reducen la molécula de adhesión de los linfocitos LFA-1, reducen también en menor cantidad la CD-2 y todavía en menor cantidad las moléculas ICAM-1 y LFA-3. Con la administración de esteroides hay una reducción del mRNA del LFA-1 y de la CD-2, lo que indica un freno en la expresión o transcripción del gen de las moléculas de adhesión o disminución en la estabilidad del mRNA. También se piensa que la acción pueda ser debida a través del GCSGCS-R que es el receptor, ya que un anticuerpo frente a este receptor, como es el RU-486, bloquea la acción antiadhesiva o antiadherente de los linfocitos. Podemos afirmar que los esteroides tienen, en parte, una acción inmunosupresora y antiinflamatoria por acción directa sobre los linfocitos alterando la relación célula a célula de los mismos (79).

El bloqueo a la reentrada de los linfocitos desde los tejidos a la sangre producido por los esteroides puede exclusivamente deberse a la reducción de las moléculas de adhesión de los linfocitos en los vasos linfáticos de los tejidos y en las células endoteliales.

Se ha demostrado la intervención de la lipocortina en el efecto inhibitor de los esteroides sobre el eje hipotálamo-hipofisario (78). Además la lipocortina regula la acción de los glucocorticoides en la liberación de prolactina, tirotrófina y hormonas gonodotróficas.

En las estructuras neuroendocrinas se demuestra la presencia de lipocortina 1. Su cuantía es importante en la parte anterior de la hipófisis, en la eminencia media y en ciertas regiones hipotalámicas como el núcleo paraventricular e hipocampo.

Existen receptores o ligandos poderosos de lipocortina en las células de la hipófisis incluidas las corticotróficas.

Los esteroides además de facilitar la traslocación de la proteína, desde el interior de la célula al exterior, aumentan la síntesis de la misma. El proceso de externalización de la lipocortina permite después el que ésta se una a receptores en células distantes de donde se produce.

Se ha demostrado que un fragmento de la región n-terminal de la lipocortina ejerce la misma función que la molécula completa.

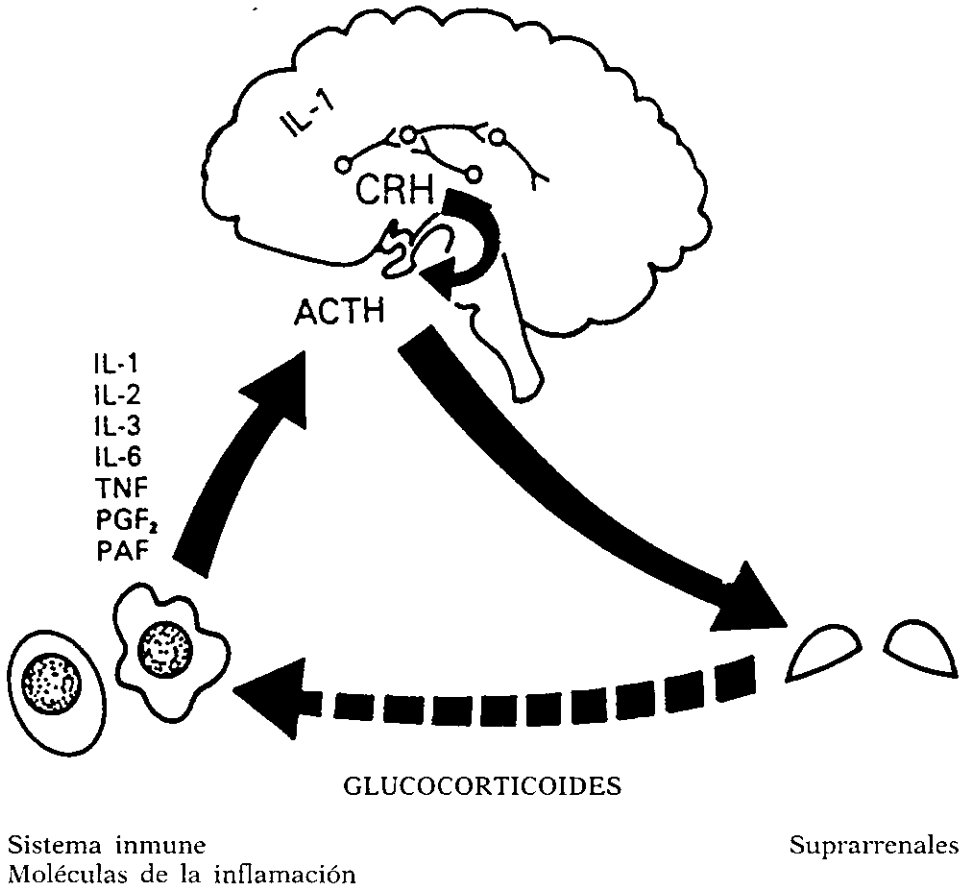
La producción de esteroides se incrementa en las situaciones de inflamación en respuesta a las citoquinas proinflamatorias, fundamentalmente la interleucina 1 –IL-1, la IL-6, la IL-8 y el TNF $\alpha$ . El eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal tiene un círculo funcional que le permite actuar de una manera inversa a la respuesta inmune-inflamatoria. Las citoquinas ponen en marcha un feedback negativo. La corticotrofina se libera por acción de varias citoquinas, en especial por la acción de la IL-1, tanto  $\alpha$  como  $\beta$ , la IL-6, la IL-8. La administración de LC11-348 intraventricular inhibe la respuesta del hipotálamo a las citoquinas. (Fig. 6).

Los glucocorticoides pueden tener una acción de inhibición de la permeabilidad del territorio venular postcapilar en los procesos inflamatorios, estimulando la síntesis de determinadas moléculas, entre ellas la «vasocortina», que es una proteína de 100 kDa distinta a la lipocortina-1.

Otro efecto importante de los esteroides sobre la inflamación se realiza modulando el tiempo de vida de las células que intervienen en la misma. Este hecho ha sido claramente señalado frente a los eosinófilos, los cuales dependen en su supervivencia de la IL-5 y del GM-CSF. Los esteroides parece ser que bloquean el efecto de esta citoquina sobre los eosinófilos, haciendo que la célula entre en la fase de muerte programada o apoptosis, posiblemente por la activación de endonucleasas específicas.

Se sabe, desde hace tiempo, que existe una resistencia frente a los esteroides en algunos individuos presentando una agrupación familiar. Esta resistencia familiar a los esteroides parece ser que es consecuencia de un defecto en el receptor de glucocorticoides y va asociado a niveles altos de cortisol y de hormona adrenocorticotropa (ACTH) en sangre. Hay una resistencia adquirida frente a la acción antiinflamatoria de los esteroides, resistencia que no se explica por variaciones de las propiedades farmacocinéticas del individuo, ni a un fallo o alteración en la unión de los glucocorticoides a los receptores, ni tampoco por un trastorno en la translocación nuclear del receptor de los glucocorticoides. En algunos individuos parece ser que la resistencia se produce por aparición de autoanticuerpos fren-

Vía neuronal de la IL-1  
Estimulación por IL-1 y otras moléculas



Sistema inmune  
Moléculas de la inflamación

Suprarrenales

FIG. 6. *Círculo de recirculación y estímulo de las moléculas de la inflamación (estrés) sobre el SNC (hipotálamo) con respuesta de CRH y posterior de ACTH y de glucocorticoides.*

te a la lipocortina-1, en otros se trataría de una alteración en la unión del receptor al GRE o por un defecto del poder de inhibición frente al GRE del AP-1. En todos estos casos no estaría alterado ni el metabolismo ni el equilibrio homeostático de los glucocorticoides, lo que justifica que en estos casos la administración de esteroides produce atrofia cortical de la corteza suprarrenal.

## ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS: UN LARGO CAMINO

Ya se conocía desde hace muchos años, papiro de Ebers, el poder analgésico y antiinflamatorio de las hojas de «mirto» desecadas utilizadas para el control de los dolores que llamaban «reumáticos de la matriz». Posteriormente hemos sabido que el mirto contiene salicilatos. Cuatrocientos años antes de Jesucristo, Hipócrates recomendó el uso de la corteza de álamo y de sauce para la fiebre y los dolores del parto. Años más tarde se vio también que la corteza de estos árboles contiene salicilatos. Hacia el año 30 después de Jesucristo, Celso habló de la inflamación y de los signos de la misma. Durante el Imperio Romano, así como en otras zonas civilizadas de la antigüedad, como China, América, determinadas plantas, además del sauce, fueron utilizadas por su acción antirreumática y antiinflamatoria.

A mediados del Siglo XVIII, el reverendo Edmund Stone en una carta dirigida al Presidente de la Real Sociedad Médica Inglesa comentaba sus experiencias terapéuticas con la toma de extractos o infusiones de la corteza de Willow (sauce). Stone señalaba en la carta que «la corteza de Willow blanco, el «*Esalix Alba Vulgaris*», que es amarga, produce una respuesta satisfactoria y brillante sobre la fiebre», era pues un brillante antipirético. Casi cien años más tarde, en el año 1827, Leroux aisló, de la corteza de Willow, un glicósido amargo al que llamó «salicin». Posteriormente la hidrólisis del «salicin» permitió la obtención de glucosa y de alcohol salicílico, llamado «saligenin», al que atribuyó la actividad antipirética. Pocos años más tarde, en el año 1838, Piria obtuvo del salicin el ácido salicílico que posteriormente fue obtenido por Cahours del aceite de gaultheria o «winter green. En el año 1860 Colbe y Lautemann, derivado del ácido fenólico, obtuvieron por vía sintética el «salicin».

La sal sódica del ácido salicílico, el salicilato sódico fue utilizado como antipirético y en especial como antirreumático por Buus en el año 1875. Años más tarde la observación de que el salicilato incrementaba la eliminación urinaria de ácido úrico hizo que fuese también utilizado en la gota. Definitivamente, en el año 1899, Dreser introdujo el ácido acetil salicílico posteriormente llamado aspirina en el campo de la Medicina, por esto, el año 1899 es una fecha

señalada en la historia de la terapéutica farmacológica de la inflamación (36). Me satisface, que por feliz coincidencia, este Discurso de Apertura del Año Académico 1999 de la Real Academia de Farmacia titulado «Farmacología de la Inflamación», sea leído en el CENTENARIO DE LA ENTRADA DE LA ASPIRINA EN LA FARMACOPEA.

J.R. Vane y colaboradores, en el año 1971, demostraron que concentraciones bajas de acetilsalicílico o aspirina inhibían el camino enzimático productor de prostaglandinas. Se vio también que la indometacina compartía esta misma propiedades (37). Este descubrimiento permitió comprender el mecanismo de acción antiinflamatoria del acetilsalicílico, así como su efecto antipirético y analgésico.

En la década de los 60 se conocía la existencia de las prostaglandinas, moléculas de constitución lipídica y de características acídicas, así como también el que éstas proceden del ácido araquidónico. Se conocía también la presencia de una enzima clave para la formación de las prostaglandinas, la prostaglandin sintetasa, enzima necesaria para la formación de las moléculas en el segundo escalón metabólico del ácido araquidónico. También se sabía que el ácido araquidónico se liberaba de los fosfolípidos de las membranas celulares por la acción de estímulos proinflamatorios como bacterias, endotoxina. Lo que no se sabía era como actuaban los fármacos que tenían propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias, fármacos que estaban representados por la aspirina y que junto a ésta se encontraban otros compuestos como la indometacina, el piroxican, el diclofenato. Se pensaba que estas moléculas, activas en la terapéutica antiinflamatoria, bloqueaban la acción de ciertos receptores celulares o interferían el metabolismo oxidativo o eran capaces de inhibir la fagocitosis o de estabilizar las membranas lisosomales. No obstante ninguno de estos mecanismos propuestos eran convincentes. Por otro lado era evidente el hecho de que las prostaglandinas, concretamente la prostaglandina E2 —PGE2— tienen una poderosa acción inflamatoria, además de producir hiperalgesia y fiebre (80). También se sabía que en los tejidos inflamados se encontraba incremento de prostaglandinas.

En el año 1971 el Prof. Sir John Richard Vane (37) aislando la enzima «prostaglandin sintetasa» la puso en contacto con el ácido



araquidónico, en unas experiencias con aspirina y en otras sin aspirina. Los resultados fueron espectaculares, sorprendentes y satisfactorios quedando perfectamente claro que el acetilsalicílico era capaz de inhibir la acción de la prostaglandin sintetasa, bloqueándose de esta forma la formación de prostaglandinas. Esta inhibición era dosis dependiente. Esta acción inhibitoria era compartida también por los otros antiinflamatorios los que constituyen el grupo de los antiinflamatorios no esteroideos —AINES—. Por este descubrimiento le concedieron a J.R. Vane, junto a Samuelsson y Bergström, el Premio Nobel en 1982. No tenían esta propiedad los analgésicos no antiinflamatorios, los antihistamínicos ni otros muchos fármacos, lo que indicaba que la inhibición de la «prostaglandin sintetasa» llamada ciclooxigenasa —COX— era una acción específica de los antiinflamatorios no esteroideos —AINES—. Pronto se vió que esta acción beneficiosa antiinflamatoria iba, en no pocas ocasiones, acompañada de importantes efectos secundarios gástricos, renales y de la función del parto. Se demostró que hay una buena correlación entre el potencial de inhibición de la ciclooxigenasa, el efecto antiinflamatorio y los efectos secundarios. Esto quedó muy claro cuando en el año 1972, al estudiar los dos isómeros del naproxeno, potente antiinflamatorio, se demostró que uno de ellos era inhibidor de la ciclooxigenasa y tenía acción antiinflamatoria, mientras que el otro isómero apenas tenía acción frente a la ciclooxigenasa y su actividad antiinflamatoria era mínima.

Los estudios sobre inflamación, realizados durante los años siguiente a este descubrimiento, permitieron ver con claridad los siguientes hechos: 1º) que las prostaglandinas intervienen activamente como moléculas de la inflamación, 2º) que los antiinflamatorios no esteroideos —AINES— son eficaces por impedir la síntesis de las prostaglandinas inhibiendo la enzima clave, la ciclooxigenasa —COX—, 3º) que la inhibición de la COX y con esto el bloqueo de las prostaglandinas, produce efectos secundarios que pueden ser graves, por impedir la favorable y necesaria acción funcional de la prostaglandinas en determinados territorios de la economía, principalmente mucosa gástrica y riñón. En el primer caso reduciendo la viabilidad de las células de la mucosa y en el segundo caso mejorando el flujo vascular renal. Todos estos hechos junto a otros como el que el acetilsalicílico, que bajo el punto de vista farmacológico tiene una

actividad mayor que el salicilato, en la práctica los dos tienen un efecto terapéutico similar. Por otro lado, el paracetamol que tiene escasa acción antiinflamatoria, tiene una intensa acción antipirética y analgésica.

Parecía evidente que debía haber prostaglandinas mantenedoras de funciones biológicas importantes y otras responsables directas de la inflamación. Igualmente parecía que debería existir una enzima formadora de las prostaglandinas funcionales y otra encargada de la síntesis de las prostaglandinas inflamatorias. Esta idea quedó perfectamente probada, cuando, en el año 1989, Phillip Needleman (81) demostró fehacientemente la existencia de dos enzimas independientes, en la síntesis de prostaglandinas. Dos isoenzimas de la ciclooxigenasa. A una se le llamó ciclooxigenasa 1, o para simplificar COX-1 y la otra ciclooxigenasa 2 o COX-2. La primera es una enzima constitutiva presente en todas las células del organismo salvo los hematíes, permanente, siempre activa. La COX-2 solo aparece por estímulos inductores, entre los cuales se encuentran los estímulos inflamatorios como físicos, químicos, bacterianos, endotoxinas, citoquinas.

La estructura tridimensional de las ciclooxigenasas indica que son homólogas en un 60%. Así pues la ciclooxigenasa 1 —COX-1—, la constitutiva, continuamente activada, genera prostaciclina en el endotelio capilar y en la mucosa gástrica, prostaglandina E2 en el riñón y en la matriz además de tromboxano en las plaquetas. Por el contrario la ciclooxigenasa 2 —COX-2— es la responsable de las prostaglandinas de acción proinflamatoria.

Si Garavito estudió y publicó la estructura tridimensional de la COX-1 ha sido M. Brauner el que lo hizo de la COX-2.

La COX-1 es una enzima constitutiva del citoplasma de las células, está acetilada en el residuo o aminoácido serina 570, mientras que la COX-2, que tiene aproximadamente el mismo peso molecular, es perinuclear en su situación y está acetilada en su residuo serina 510. El RNA mensajero de la COX-2 tiene 4,5 kilobases y el de la COX-1 tiene 2,8.

Como después veremos estas dos isoenzimas, la COX-1 y la COX-2, tienen además una especificidad farmacológica diferente, esto

quiere decir que no todos los antiinflamatorios no esteroideos actúan por igual frente a las mismas, lo que permite manejos terapéuticos importantes y ventajosos. Los fármacos que tienen una acción inhibitoria frente a la COX-1 y a la COX-2 tienen efectos farmacológicos antiinflamatorios importantes, pero también efectos secundarios no deseables.

Los antiinflamatorios que inhiban con mayor intensidad a la COX-1 que a la COX-2 tendrán fuerte efecto secundario frente a una acción terapéutica discreta. Finalmente los fármacos que tengan mucho poder frente a la COX-2 y poco frente a la COX-1 serán de alta eficacia terapéutica y de gran seguridad frente a efectos secundarios. En los últimos años se ha iniciado una intensa investigación para obtener antiinflamatorios específicos frente a la COX-2, algunos ya están en el mercado.

En la lección magistral que el prof. Sir John R. Vane pronunció el pasado 1 de octubre de 1998 en el Congreso de Arterioesclerosis en Cádiz (80), indicó que «SI DENTRO DE TRES O CUATRO AÑOS LE INVITÁBAMOS, PARA PRONUNCIAR LA MISMA CONFERENCIA SOBRE «ANTIINFLAMATORIOS», PODRÍA APORTAR INTERESANTES Y POSITIVOS RESULTADOS SOBRE LA UTILIZACIÓN DE FÁRMACOS ANTI-COX-2 ESPECÍFICOS». EN AQUEL MOMENTO, 1 DE OCTUBRE DE 1998, CONSIDERABA QUE TODAVÍA NO DEBÍA HABLAR DE RESULTADOS.

El acetilsalicílico es mucho más potente frente a la COX-1 que frente a la COX-2 e igual ocurre con el piroxicam que es muchísimo más activo frente a la COX-1 que frente a la COX-2. Si la acción antiinflamatoria y la generadora de efectos secundarios depende del poder de inhibición de la COX-2 y de la COX-1 respectivamente, parece evidente que la potencia inhibidora del fármaco frente a una u otra ciclooxigenasa determinará su perfil terapéutico.

El piroxicam, que tiene una IC<sub>50</sub>, o «concentración requerida para inhibir la actividad de la COX-1 de 0,002 nm/l y de 0,6 para la COX-2, tiene muchos efectos secundarios en especial sobre el estómago. Parecida a la acción de la aspirina. La relación entre el poder de inhibición frente a una u otra COX se puede expresar por un cociente, siendo el numerador el valor de la CI-50 frente a la COX-2 y el denominador frente a la COX-1 (82). Cuando mayor sea el

cociente o índice, mayor serán los efectos secundarios. El piroxicam tiene el índice de 250, más elevado, frente al meloxicam que lo tiene más bajo, de 0,33. La aspirina lo tiene de 166, la indometacina de 60 (tabla V).

La COX-2 se encuentra fundamentalmente, y se estimula naturalmente su producción, en los macrófagos, en los granulocitos, en las células mesangiales de la rata, en la sangre entera humana, en los leucocitos humanos. La COX-1 se encuentra en los macrófagos, en las plaquetas, en la mucosa gástrica. La COX-1 genera prostaglandinas para funciones fisiológicas como protección gástrica, mantenimiento de la actividad antitrombogénica del endotelio vascular, mantenimiento del flujo renal sanguíneo.

TABLA V

*Antiinflamatorios no esteroideos.  
Índice del valor IC50 COX-2/COX-1*

AINEs	COX-2/COX-1
PIROXICAM	250
TOLMETÍN	175
ASPIRINA	166
SULINDACO	100
INDOMETACINA	60
TOLFENÁMICO	16,7
IBUPROFENO	15
PARACETAMOL	7,4
SALICILATO	2,8
FLURBIPROFENO	1,3
CARPROFENO	1
DICLOFENACO	0,7
NAPROXENO	0,6
MELOXICAM	0,33

El índice expresa la relación entre el diferente poder de inhibición de la COX-2 y de la COX-1. Los valores están ordenados de mayor a menor. Los de mayor «índice» tienen efectos secundarios más intensos, lo que indica que el poder de inhibición frente a la COX-1 es mayor que frente a la COX-2.

La inhibición de la COX-2 con moléculas altamente específicas permitirá, ya que ésta es la que se sobreexpresa en el cáncer del colon y de la piel, ser utilizados en estos dos cánceres, por otro lado pueden utilizarse estos inhibidores en la prevención del parto pretérmino al retrasarlo, al prevenir también la ovulación. Se ha señalado que la administración de indometacina por problemas reumáticos de enfermos con Alzheimer retrasa la evolución de esta enfermedad.

En la investigación de los antiinflamatorios no esteroideos ha sido de gran utilidad y lo está siendo la obtención de los ratones knockout, que son ratones que carecen de la Cox-1 o de la COX-2. Curiosamente los ratones que carecen de la COX-1 deberían tener mucha patología gástrica cosa que no ocurre, ya que indudablemente las defensas de la mucosa gástrica no dependen solo de la prostaciclina sino también de péptidos relacionados con la entrada del calcio y del propio óxido nítrico. En estos casos la acción lesiva sobre el estómago de la indometacina es menor, pero sigue existiendo porque tal vez exista otro mecanismo lesivo sobre el estómago. Los ratones que carecen de la COX-2 no deberían tener inflamación, pero sin embargo se produce ésta, ya que la ausencia de la COX-2 deja libre a la COX-1 y, además, la otra vía metabólica del araquidónico, la vía lipooxigenasa, permanece activa y puede incluso incrementarse cuando la ciclooxigenasa ha sido inhibida (80).

Los antiinflamatorios no esteroideos son ácidos orgánicos con gran poder de unión a la albúmina desplazando a otros fármacos, pudiendo desencadenar efectos secundarios indeseables. La unión a las proteínas, a la albúmina, puede alcanzar hasta el 99% del AINES siendo habitual entre el 98 y 99%. Algunos, como la indometacina, tienen una fijación solo del 90% y la oxaprocina del 92%. No obstante no existe una relación matemática entre unión a proteínas y desplazamiento a otras moléculas, variando según el fármaco —AINES—. Así por ejemplo son potentes moléculas desplazando a los anticoagulantes cumarínicos el ácido mefenámico, la fenilbutazona, los salicilatos, en contraposición a la indometacina que lo es mucho menos. Este desplazamiento es temporal y naturalmente no obliga siempre a cambios de la dosis. La liberación o desplazamiento de su unión a la molécula de albúmina no solamente produce aumento de los niveles del fármaco en sangre, sino que incrementa su elimina-

ción renal. Por otro lado el desplazamiento, al que hago referencia, permite que se abran espacios corporales que previamente lo estaban. Es por lo tanto muy importante conocer el tiempo en el cual la liberación o desplazamiento del fármaco alcanza significado clínico, aspecto éste que se está estudiando para todas las moléculas de AINES.

Otro hecho es que estos antiinflamatorios pueden inhibir la secreción de otros ácidos orgánicos en el túbulo renal proximal y así disminuir el aclaramiento, como ocurre con la penicilina, la furosemina, el methotrexato y otros. Con el methotrexato los niveles pueden ser especialmente peligrosos, con la furosemida las modificaciones farmacológicas en la clínica no se consideran importantes, al igual ocurre con la penicilina ya que los cambios en los niveles no tienen significación terapéutica por ser éste muy grande. Con los diuréticos de asa y los diuréticos tiazídicos la modificación en la respuesta es despreciable.

Por otro lado, la eliminación renal de algunos antiinflamatorios no esteroideos está reducida en los individuos de edad mayor o de tercera edad, especialmente con el naproxeno, con el oxaprocin y con el benoxaprofen, lo que aconseja a realizar modificaciones en la dosis. Por el contrario con el ibuprofen y con el etodolat no se requiere ningún cambio en la dosis. En los enfermos con hepatopatía la inhibición en la formación de prostaglandinas, fisiológicamente necesarias, conduce a situaciones peligrosas, hecho que también se da en los enfermos de la tercera edad.

Se aconseja que ante situaciones especiales se determine la concentración del fármaco «libre», como es el caso de los enfermos renales, ya que la inhibición en la formación de prostaglandinas, aunque de escasa cuantía, puede tener consecuencias graves. Igual ocurre con las situaciones con hipoalbuminemia, en las cuales las pérdidas renales aumentan al haber un nivel de fármacos libre más elevado, lo que paralelamente puede producir efectos secundarios.

## **EFFECTOS SECUNDARIOS DE LOS AINES**

Entre los efectos secundarios de los AINES hay que tener presente por su importancia los siguientes: 1) la reducción que pueden

producir sobre el flujo renal, efecto que puede llegar a elevar significativamente la creatinina en sangre y a la retención acuosa, 2) acción sobre el tracto digestivo, que es el efecto secundario más importante por su frecuencia y peligrosidad.

La frecuente gastropatía por AINES está fundamentalmente desencadenada porque estos, los que se han utilizado y se siguen utilizando, disminuyen mucho los mecanismos de «citoprotección» de la mucosa gástrica. Ya se ha señalado que la COX-1 es una isoenzima que se expresa, de manera «constitutiva», en muchos tejidos y ejerce una capacidad de defensa para las células gástricas y para la homeostasis vascular, al permitir la síntesis de prostaglandinas citoprotectoras. De una manera global se puede decir que la inhibición de la COX-1 reduce la síntesis de prostaglandinas citoprotectoras. La COX-2 es una isoenzima que se «induce» y se expresa en los tejidos inflamados tras estímulos proinflamatorios como las citoquinas, endotoxinas, hormonas, factores de crecimiento, mitógenos, sin embargo se expresa de una manera constitutiva en las neuronas del cerebro.

Cuanto menor sea el cociente COX-2/COX-1 menos efecto tóxico gástrico tendrá el AINES, alcanzándose la situación ideal con el empleo de los nuevos y futuros antiinflamatorios, inhibidores específicos de la COX-2.

Es evidente que hay una interrelación entre patología gástrica, inflamación y AINES, pero son muchas las circunstancias y factores que pueden modificar esta relación. Son factores lesivos para la mucosa gástrica, además de la hipotensión, el factor de necrosis tumoral —TNF—, el PAF, el tromboxano —TxA<sub>2</sub>—, el NO. Se sabe que la inyección de endotoxina en el individuo previamente normal produce lesión gástrica con ulceraciones e incluso hemorragias. Esta respuesta se había interpretado, en parte, por la hipotensión que produce la endotoxemia, ya que la hipotensión condiciona una pérdida de la viabilidad de la mucosa gástrica. En los últimos años se ha demostrado que la endotoxina produce elevación de estos, de PAF, del tromboxano y de NO (83).

Se sabe que el NO, procedente de la acción de la sintasa endotelial —NOS—, no interviene en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, sin embargo la isoforma del NOS produce can-

tidades grandes de óxido nítrico que pueden contribuir al daño gástrico. En estudios experimentales se ha visto que la inyección de endotoxina estimula la «isoforma» de la sintasa del óxido nítrico, la iNOS. La inhibición de esta iNOS mediante la aminoguanidina evita la lesión gástrica o hace que sea menor. Este efecto inhibitorio y protector del daño gástrico también se ha demostrado tras la administración de un tóxico gástrico como puede ser el alcohol. Por otro lado la endotoxina aumenta o activa al gen de la COX-1, la COX citoprotectora, lo que permite como hecho paradójico que la lesión gástrica, producida por la indometacina, se reduce cuando la endotoxina se administra de manera continuada.

Es bien conocida la gastropatía con ulceraciones e incluso hemorragias que provocan los antiinflamatorios no esteroideos. Menos conocida es la enteropatía por AINES en la cual existe una alteración de la permeabilidad epitelial, incremento bacteriano especialmente gérmenes Gram negativos y úlceras intestinales (84).

Esta patología por AINES está en gran medida olvidada. Es conveniente insistir que algunas manifestaciones digestivas que presentan los enfermos que toman de manera continua AINES, como es el caso de los afectos de artritis reumatoide, es secundaria a una enteropatía. Los estudios realizados en este campo han demostrado que la acción tóxica frente a la mucosa entérica es más propia de fármacos que tienen circulación enterohepática, lo que favorece que la permanencia del fármaco en el intestino sea larga, como el Diclofen.

En la enteropatía por AINES existe aumento de permeabilidad de la célula intestinal, así como también presencia de neutrófilos en la mucosa e incremento de la flora bacteriana gram negativa en la luz intestinal. El que un antiinflamatorio no se elimine por la bilis, como pasa con la aspirina y no exista circulación enterohepática, va a favor de una menor capacidad lesiva sobre el intestino. La indometacina aumenta tremendamente la permeabilidad, en cambio no lo hace la nabumetona que además, en su forma de profármaco, no es acídica, no se disocia y no se concentra en las células epiteliales gástricas. Comentaré el ejemplo de este último fármaco.

La nabumetona es un antiinflamatorio no esteroideo. Su metabolito activo es el ácido 6-metoxi-2-naftilacético que es casi inhibidor selectivo de la COX2. Como su molécula no es acídica no se disocia



y no se concentra en la célula gástrica. Tanto la nabumetona, como su metabolito, se unen con fuerza a la albúmina plasmática. Un aspecto importante es que ni la nabumetona ni su metabolito tienen circulación enterohepática, aspecto que se considera esencial para la lesión entérica. Se elimina por la orina conjugada con el glucourónico. A concentraciones de 1000 micromoles/l la nabumetona no tiene acción sobre la síntesis de prostaciclina ni de PGE2 en la mucosa gástrica.

### LOS ANTIMETABOLITOS EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN

Aquí me referiré solo al Methotrexato.

Se sabe que el methotrexato mejora la calidad de vida de los enfermos con artritis reumatoide, hecho señalado ya en el año 1951 por Gubner y posteriormente demostrado en sucesivas publicaciones. Esta acción terapéutica del methotrexato en la artritis reumatoide puede ser más que por su efecto inmunosupresor por una acción antiinflamatoria, al frenar la producción de leucotrienos. Por ahora no se ha podido demostrar que las dosis pequeñas de methotrexato, que se utilizan en la artritis reumatoide, tengan realmente un efecto inmunosupresor. Se ha señalado que el methotrexato suprime la quimiotaxis de los polinucleares. En este sentido señalaré que la cantidad de LTB4 que producen los polinucleares de los enfermos con artritis reumatoide, al día siguiente de la dosis de methotrexato, se reduce en más de un 50%, siendo esta reducción no solamente del LTB4 liberado sino también del retenido en la célula.

El methotrexato no reduce los niveles del ácido araquidónico que se libera, ni de PAF, lo que indica que actúa a un nivel bajo en el camino metabólico del ácido araquidónico. Los estudios parecen indicar una reducción de la actividad de la 5-lipooxigenasa ya que se reduce también los niveles de LTA4 así como los niveles del 5-HETE. También inhibe a la enzima epóxido hidrolasa. Se ha señalado que este efecto inhibitorio o modulador sobre la inflamación, que ejerce el methotrexato, podría ser secundario a la reducción que el methotrexato ejerce sobre la síntesis proteica, con la consiguiente reducción en la síntesis de la 5-lipooxigenasa y de la enzima epóxido hidrolasa.

## NUEVAS LÍNEAS DE ACTUACIÓN FRENTE A LA INFLAMACIÓN

Se está investigando con el fin de bloquear la acción de alguno de los mediadores de la inflamación, tal como ha sido comentado en las primeras páginas de este DISCURSO. Los investigadores utilizan modelos experimentales y clínicos y me limitaré aquí a comentar solamente algunas de estas experiencias y resultados.

### ANTI-COX

Ya he comentado en páginas anteriores algunas de las investigaciones encaminadas a encontrar fármacos antiCOX-2 puros.

Los inhibidores de la proteína «tirosin quinasa» suprimen el efecto que el lipopolisacárido produce sobre los macrófagos, con aparición de COX-2 (85). Es importante en este sentido saber el camino que sigue el lipopolisacárido para producir la expresión incrementada de COX-2 por los macrófagos. El lipopolisacárido activa proteínas del grupo de los mitógenos, con base en las protein-quinasas así como el Factor de Transcripción Nuclear o NF-kB.

El NF-kB, que es el «factor de activación nuclear» se une al DNA de modo heterodimérico después de perder en el citoplasma su fragmento inhibidor, la IκB. Este hecho se produce después de ser activado por un gran número de agentes como citoquinas proinflamatorias, especialmente el TNFα, radiaciones ultravioletas, radiaciones gamma, proteínas bacterianas y víricas, lipopolisacáridos, RNA nativo y radicales oxidativos.

Importa señalar aquí que, en el Departamento de Biología Molecular y Celular de la Universidad de California, Berkeley, J. Suzuki y colabs. han demostrado que el acetato de vitamina E o alfa-tocoferol sulcinato, es capaz en cierta medida de bloquear la activación del NF-kB producido por el TNF, lo que lleva implícito una acción terapéutica antiinflamatoria (86).

El dolor o hiperalgesia en la inflamación se produce por la inyección de bradiquinina, TNF, IL-1b. El bloqueo de la ciclooxygenasa-2 puede disminuir este efecto. La dexametasona y la lipo-

cortina-1, fracción 2-26, inhiben la respuesta dolorosa antes señalada.

Por esto tiene gran interés la investigación encaminada a la búsqueda de moléculas antiprostaglandinas. En este sentido Portanova y colabs., del Departamento de Biología Molecular de Searle-Co, en San Luis, utilizando un anticuerpo monoclonal frente a la PGE<sub>2</sub>, el 2B5, ha conseguido neutralizar la respuesta inflamatoria y la hiperalgesia. Esta respuesta satisfactoria fue acompañada de la desaparición de la PGE<sub>2</sub>. Como sabemos la PGE<sub>2</sub> participa muy activamente en la producción de inflamación, así como de la hiperalgesia que acompaña a ésta (87).

Estos estudios se realizaron sobre un modelo experimental de artritis por adyuvante. La prostaciclina también se demostró en este modelo con actividad proinflamatoria, pero su efecto es escaso y de corta duración, mientras que el provocado por la PGE<sub>2</sub> es de varias horas. El anticuerpo 2B5 también se mostró eficaz bloqueando la respuesta inflamatoria cuando la PGE<sub>2</sub> de origen exógeno se inyectó en la articulación. Curiosamente en estas experiencias los niveles de mRNA de la IL-6, así como los niveles de ésta en sangre, descendieron muy significativamente, lo que indica que la PGE<sub>2</sub> ejerce una acción reguladora sobre la IL-6 que como se sabe es poderosamente proinflamatoria. Estos resultados abren una puerta de esperanza a la obtención de fármacos y preparados biológicos que impidan la acción de las moléculas de la inflamación como es en este caso la PGE<sub>2</sub>.

El interés por los fármacos inhibidores selectivos de la COX-2 ha empezado hace unos años. El conocimiento exacto de la estructura molecular, así como sus dominios fundamentales, ha permitido elaborar fármacos capaces de interactuar con la molécula de ciclooxigenasa impidiendo su acción enzimática. El por qué de la inhibición y, más concretamente el de la selectividad para la Cox-2 se debe a los lugares de acción, a los puntos de unión entre fármaco y enzimas. Un grupo de fármacos representativos son el DUP-697, el N-398, el SC.58125, el SC-236. Estos se unen a la COX-2 de un modo firme, no por uniones covalentes.

Estos fármacos inhiben de manera irreversible a la ciclooxigenasa 2 y de manera reversible a la COX-1, siendo esta inhibición tiem-

po-dependiente. Esta selectividad desarrollada por estos fármacos antiCOX-2 se aprovecha fundamentalmente de la diferencia en un aminoácido existente en el lugar 509. En la COX-2 el aminoácido es la valina, mientras que en las COX-1 es la isoleucina. El aminoácido en posición 509 se encuentra en la boca o en la entrada de la molécula de la ciclooxigenasa. El SC-58123 en la artritis experimental ha sido altamente eficaz, reduciéndose la inflamación así como la presencia de prostaglandinas, en especial la PGE2. El SC-58125 (Searle) es el 1((4 metilsulfonil) fenil)-3-trifluorometil-5-(4 fluorofenil)pirazol.

## ANTI-PAF

Las molécula antiPAF parece ser que se muestran activas, terapéuticamente eficaces, en ciertos marcos clínicos, por el momento no en todos.

El modelo experimental de inflamación pancreática producida por la liberación de radicales libres, se ha demostrado eficaz para estudiar la intervención de agonistas y antagonistas frente a moduladores de la inflamación. En este sentido se ha estudiado el factor activador de las plaquetas, —PAF—, y el leucotrieno D4 —LTD4—, como activadores de inflamación y como inhibidores o antagonista del PAF el BN-52021 y el MK-886, inhibidor del LTB4 el superóxido dismutasa (88).

El resultado ha sido alentador ya que el infiltrado por polimorfonucleares y los niveles de LTB4, tras la infusión de la xantina/xantina oxidasa en el páncreas, son sensiblemente menores tras la administración del antagonista del PAF, el inhibidor del LTB4 o la dismutasa superóxido.

La rupatadina (UR-12592), producto de los laboratorios Uriach, tiene una clara acción anti PAF y antihistamínico, siendo este efecto de gran intensidad y duración. La rupatadina bloquea la aparición de hipotensión y broncoconstricción en los cobayas en respuesta a la histamina y al PAF. También es eficaz frente a la mortalidad en las ratas. El UR-12592 inhibe la agregación de las plaquetas producida por el PAF al interaccionar sobre los receptores del PAF espe-

cíficos en la membrana de las plaquetas. Se puede afirmar que la rupaladina tiene gran porvenir en el tratamiento de procesos alérgicos e inflamatorios, en los cuales tanto el PAF como la histamina juegan un papel importante(89).

Parece ser que el óxido nítrico y el PAF son mediadores importantes de la rotura de la permeabilidad microvascular durante la endotoxemia y que esta acción no es dependiente directamente de la adhesión de los leucocitos a los endotelios del sistema venular postcapilar. Esta respuesta a la endotoxina puede ser frenada si previamente se administra el antagonista del PAF, el ABBOTT-87648 o el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico, la L-NAME.

La sintasa del óxido nítrico, la inducida por acciones estimulantes de la inflamación, juega un papel importante en la cistitis hemorrágica producida por la ciclofosfamida. El inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, el L-NG-nitroarginina metilester y el L-NG nitroarginina, reduce la lesión producida por la ciclofosfamida. Por otro lado, la administración de un factor inhibidor de la activación del PAF, el antagonista PN52021 también bloquea la acción tóxica de la ciclofosfamida ya que frena la producción de sintetasa del óxido nítrico, mientras que no reduce la sintetasa ya constituida.

La acción lesiva de la gentamicina y de la ciclosporina A frente al glomérulo y al túbulo renal parece que está, inducida en gran medida, por la liberación de PAF. Según el Dr. Rodríguez Barberi, en el Instituto Reina Sofia de Investigación Nefrológica del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, la gentamicina produce una elevación de la creatinina, reducción del aclaramiento de la misma así como incremento de la excreción urinaria de N-acetil-b-D-glucosaminidasa y de fosfatasa alcalina, expresión estas últimas del daño tubular. La administración protectora del antiPAF BN-5202 evita todos estos fenómenos funcionales y además las lesiones histológicas no se producen.

En el asma la aplicación de un inhibidor del Factor Activador de Plaquetas, el PAF concretamente el zieluton y el WEB 200086 no ha dado ningún resultado positivo.

La experiencia clínica realizada en el Reino Unido (1993) con el antiPAF, el WEB 2086, por vía oral, en enfermos asmáticos bajo

tratamiento esteroideo, no logró resultados terapéuticos satisfactorios pese a existir pruebas evidentes de su buena biodisponibilidad, como justifica su acción agregante sobre las plaquetas y la prevención de broncoconstricción provocada. Este sorprendente resultado obliga a considerar con mucha atención todos los eslabones de la compleja cascada de la inflamación, así como el peso real de cada uno de ellos en la provocación y/o mantenimiento de la inflamación.

Hay que preguntarse ¿es posible que este resultado negativo se deba a una dosis escasa, o es posible que esto se deba a que el momento de la administración no ha sido el correcto? Lo que sí obliga es a buscar un eslabón, o los que sean necesarios, para comprender por qué la activación de las plaquetas y de los neutrófilos, que juegan un papel importante en la inflamación, cuando se inhiben por la acción del antiPAF no produce resultado beneficioso. Tal vez, y esto indudablemente es así, hay otros factores que intervienen en la inflamación derivados unos de las plaquetas y otros derivados de los leucocitos. Puede también que la dosis haya sido escasa.

## ANTILEUCOTRIENOS

En esta línea de actuación hay resultados muy esperanzadores.

Se está tratando de obtener inhibidores de activación de la 5-lipooxigenasa de vida media larga, con lo cual el efecto deseado se puede potenciar. Con este planteamiento se ha obtenido la anti5-lipooxigenasa, APT-761, que tiene una duración «in vivo» estudiado en los monos de 40 veces más que la molécula inicial de la cual proviene. Es evidente que en la enfermedad inflamatoria intestinal, concretamente en la colitis ulcerosa y en la colitis experimental producida en los animales mediante la administración de dextrano, hay un incremento de la actividad de la 5-lipooxigenasa, por esto se ha obtenido una respuesta eficaz con la utilización de un inhibidor de la proteína activadora de la 5-lipooxigenasa, el BAY-I1015 (90).

La inhibición de la proteína activadora de la 5-lipooxigenasa, en la situación de descarga broncoconstrictora, está contrarrestada por la utilización de un inhibidor, como es el caso del BAYx1005 a la dosis de 500 mg 2 veces al día. Con este resultado se reducen los leucotrienos sulfidopépticos.

La conservación de las vísceras para el trasplante en medio térmico bajo, es decir con enfriamiento o hipotermia, en algunas ocasiones en la reperfusión va acompañado de lesiones importantes que dificultan la buena evolución del trasplante y se ha visto que hay una elevación muy importante de la infiltración de los neutrófilos, por ejemplo en el intestino delgado. La utilización de inhibidores del leucotrieno B<sub>4</sub> mejoran considerablemente la respuesta en especial cuando se utiliza el A-64077 o zileuton.

Los productos metabólicos de la 5-lipooxigenasa, con producción del 5-HETE, tienen una actividad estimuladora de las células del cáncer de próstata. Esto se ha visto en células tumorales humanas en cultivo. La utilización de un inhibidor de la 5-lipooxigenasa, como el AA861 y el MK886, frena el crecimiento tumoral.

Los leucotrienos tienen una importancia grande en la patogenia de la colitis ulcerosa. Los trabajos que se han realizado bloqueando la síntesis de los leucotrienos mediante inhibición de la 5-lipooxigenasa con el MK-591 han dado un resultado positivo «in vitro» pero no «in vivo» por el momento. Se está investigando el por qué de esta situación. Los mismos resultados se han obtenido con el zileuton.

Utilizando los inhibidores de la ciclooxigenasa, como el Ibuprofen, Naproxen e Indometacina, se ha visto que la sustitución del ácido carboxílico por una n-hidroxiurea transforma la acción en inhibidor de la 5-lipooxigenasa. Igualmente ocurre cuando se reemplaza el ácido carboxílico por una molécula de 4-hidroxitiazol.

El zafirlukast, el montelukast y el branlukast, inhibidores del receptor de los leucotrienos, tienen una acción beneficiosa sobre el árbol bronquial y no tiene acción tóxica sobre el hígado. El Montelukast ya se encuentra en el mercado (91).

## LA MODULACIÓN DEL NO

Se está produciendo una intensa investigación en el control de la producción del NO, especialmente el debido a la sintasa inducida.

Está demostrado que el óxido nítrico interviene en las lesiones producidas por endotoxinas, concretamente la uveítis tras la inyec-

ción de endotoxina. La inhibición de la NO sintetasa por el L-NAME, que es la N-G-nitro-L-arginina metil éster, frena la respuesta lesiva pero sin embargo aumenta la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular. La opción de bloquear la adhesión de los leucocitos mediante un inhibidor de la 5-lipooxigenasa potencia las posibilidades terapéuticas del inhibidor de la NO sintetasa.

## BLOQUEO DE LA ADHESIÓN LEUCOCITARIA

Este es un campo de investigación muy atractivo, que realmente está empezando. Tengamos presente que la adhesión de los leucocitos al endotelio es una de las primeras fases de la inflamación, lo que da aún mayor realce a estos trabajos.

En la inflamación un aspecto básico es la adhesión de leucocitos sobre la superficie endotelial y su emigración a través de la pared vascular hacia los tejidos. Las células endoteliales juegan en esto un papel muy importante expresando sobre su superficie moléculas de adhesión como el VCAM-1, ICAM-1 y las quemoquinas, todo ello como respuesta a las citoquinas entre las que se encuentra el TNF y la IL-1.

La inhibición de la 5-lipooxigenasa frena la respuesta inflamatoria reduciendo la cantidad de moléculas de adhesión VCAM-1. Esta acción es específica del inhibidor de la 5-lipooxigenasa al bloquear la acción de la IL-1 sobre la célula endotelial con producción de VCAM-1.

## MODULACIÓN DIETÉTICA DE LA INFLAMACIÓN

Es un hecho conocido que diferentes ácidos grasos de la dieta se incorporan en las estructuras fosfolípídicas de las membranas celulares. Este hecho tiene mucho interés ya que los productos oxidativos procedentes de estos compuestos estructurales varían según el tipo de ácido graso y con ello, lo que es más importante, las consecuencias biológicas que se originan de los productos metabólicos.

No tienen los mismos efectos los derivados del ácido araquidónico que los del ácido eicosapentaenoico, ni los del ácido docosahexae-



noico. Los eicosanoides dienoicos derivados del ácido araquidónico, como la prostaglandina E2 —PGE2—, el tromboxano A2 —TxA2—, los leucotrienos B4-C4 —LTB4, LTC4— tienen importantes acciones proinflamatorias. Por el contrario los derivados de los ácidos antes citados no tienen estas acciones nocivas. El araquidónico proviene de la dieta grasa animal y también de la vegetal, en especial rica en ácido linoleico, como el aceite de girasol, ya que puede pasar a ácido araquidónico. Los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico provienen de las grasas de los peces.

Diferentes estudios epidemiológicos señalan que una alimentación rica en aceites de los peces, mejoran ciertas enfermedades inflamatorias como el asma, el psoriasis, la artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria intestinal, el lupus eritematoso sistémico.

## **EL FUTURO TERAPÉUTICO YA HECHO REALIDAD**

El conocimiento de la existencia de las dos ciclooxigenasas, la COX-1 y la COX-2 ha forzado la maquinaria de la investigación farmacológica para obtener compuestos específicos anti COX-2, es decir antiinflamatorios que tengan un COX-2/COX-1 muy bajo. Ya he citado en los comentarios anteriores algunos de estos compuestos, pero me interesa ahora puntualizar la presencia de algunos de estos que ya están en el mercado o en un grado de investigación muy avanzado.

En primer lugar mencionaré al MELOXICAN (Boeringer Ingelheine) que ya está en el mercado. Este preparado tiene un COX-2/COX-1 de 0,3. Próximo a salir al mercado está el CELEBREX (Searle) y el VIOXX (Merck-Co). Están todavía en investigación el MK-966 en fase III (Merck-Co), el JTE522 en fase II (Japan Tobacco), el MK 663 en fase II (Merck-Co), el L752860 en fase I (Merck-Co), el L745337 en fase preclínica (Merck-Co).

Ya está abierta la primera puerta del empleo terapéutico de bloqueantes de los receptores de los leucotrienos sulfidopépticos en la inflamación, especialmente en el asma. El Montelukast se ha mostrado eficaz en el control del asma leve y moderado permitiendo su utilización reducir la dosis de esteroides inhalados. También se ha

demostrado la eficacia de Montelukast en el asma desencadenado por el esfuerzo físico. Por el momento no parece eficaz el antiPAF WEB2086.

También están en estudio algunos fármacos ANTINEUROQUINAS, como el CP96345 en fase I (Pfizer), el NOLTITANTIUM BESILATO en fase I (Sanofi), el L733060 en fase preclínica (Merck-Co) y el NEUROKININ ANTAGONIST en fase preclínica (Telck). Estos fármacos son antiinflamatorios, pero con especial indicación para el dolor y el prurito.

Igualmente se están investigando fármacos con acción frente a la bradiquina como el BRADYKININ ANTAGONIST, en fase preclínica (Scios), el FR 173657 también en fase preclínica (Fujisawa).

## ¿QUÉ LE PEDIRÍAMOS A UN FÁRMACO ANTIINFLAMATORIO?

En la inflamación no es posible un factor único responsable de la misma, incluso algunos de ellos actúan sobre otros incrementando su presencia y su actividad. Además el proceso dinámico de la inflamación hace que la cascada de factores que la desencadenan, la mantienen y la amplían, condiciona que los agentes activos e importantes en un momento determinado no lo sean en otro. Lo mismo ocurre en el complejo balance de la hemostasia. Este concepto en modo alguno descarta el que haya, entre todos los factores que intervienen, alguno que sea preferencial o más importante. En la actualidad es el grupo de las prostaglandinas los factores que parecen tener el atributo de preferenciales.

Por todo esto y por lo que ha sido expuesto con anterioridad, si tuviese que trazar el perfil de un antiinflamatorio ideal, diría que: el fármaco antiinflamatorio ideal debe actuar bloqueando, inhibiendo, diversos escalones o circuitos que se desarrollan en el complejo proceso de la inflamación. Por otro lado, el antiinflamatorio ideal es aquel que, siendo muy eficaz, no tenga efectos secundarios indeseables. Por añadidura deberá tener buena biodisponibilidad y un efecto de largo tiempo de duración. Este fármaco no debe ser económicamente gravoso y además su efecto terapéutico, su acción antiinflamatoria, sea de alcance universal, es decir se extienda a la

totalidad del organismo, piel, articulaciones, .....-pulmón, mucosa intestinal, pared vascular, SNC, riñón.

Tal vez si los esteroides no tuviesen los efectos secundarios que tienen, la terapia de la inflamación giraría exclusivamente en torno a los glucocorticoides, pero a los enormes beneficios terapéuticos que aportan hay que unir las consecuencias, no pocas veces desagradables, que desencadenan, en especial en los tratamientos prolongados.

Por todo esto el campo de la terapia antiinflamatoria ha sido y está siendo explorado desde muchos puntos de actuación. Cuanto mejor y más sepamos los factores desencadenantes, los mecanismos que la mantienen, los que la activan y la potencian, así como también sobre los que hacen que entre en cronicidad y los que puedan inhibirla... será más fácil, o al menos más posible, la obtención de fármacos antiinflamatorios con gran poder terapéutico y alta especificidad.

### **UN ESPERANZADOR COMENTARIO FINAL**

Nos equivocamos si como clínicos o farmacólogos no tenemos una visión amplia de la patología inflamatoria. No podemos limitarnos a proyectar esta patología, la de la inflamación, exclusivamente al campo de las enfermedades osteoarticulares, ¿por qué es que acaso en la patología del glomérulo no interviene la inflamación? Sería un gran error olvidar que en la limitada área del glomérulo enfermo aparecen prostaglandinas, citoquinas, anafilatoxinas... Recordemos que cuando en los tratamientos de las glomerulonefritis administramos glucocorticoides y antitumorales (ciclofosfamidás) estamos tratando inflamación. ¿Será posible diseñar tratamientos antiinflamatorios más eficaces en las glomerulonefritis?

Nos podemos preguntar también si será posible, en un futuro, elaborar pautas terapéuticas frente a la arterioesclerosis, que incluyan fármacos antiinflamatorios o moléculas biológicas capaces de bloquear la respuesta inflamatoria. Sírvanos de ejemplo lo que está ocurriendo con el asma bronquial, que hemos pasado de la utilización de broncodilatadores al empleo de esteroides, primero sistémi-

cos y después locales, pero muy recientemente estamos utilizando moléculas capaces de bloquear en un punto determinado la acción de los leucotrienos. Igualmente ¿será posible actuaciones antiinflamatorias en una enfermedad tan frecuente como la osteoporosis?

El descubrimiento de la COX-2, la ciclooxigenasa inducida, ha permitido, con la aplicación de las modernas técnicas de biología y química molecular, conocer perfectamente su estructura y con ello diseñar fármacos específicos para la inhibición de su acción enzimática. Esta ola de nuevos AINES, los AINES anti COX-2, no ha hecho más que empezar, presumo que en el plazo de unos años esta ola alcanzará proporciones de maremoto. Por otro lado el poder elaborar moléculas que bloqueen a los receptores específicos de la cascada de la inflamación abre caminos de un alcance incalculable, pero estoy seguro que estará lleno de positivos efectos terapéuticos. Un claro ejemplo lo tenemos ya con el antireceptor de los leucotrienos. No dudo que en el futuro mejoraran los preparados antiPAF y podrán ser más útiles en la clínica que lo que han sido hasta ahora. Menos probable me parece la utilización de los antiTxA2. Está abierto con resultados esperanzadores el camino de las antiprostaglandinas como se ha visto con la anti-PGE2.

Muy interesante me parece el obtener anticuerpos frente a las moléculas de adhesión los neutrófilos y macrófagos ya que estos anticuerpos bloquean la acumulación y activación de los mismos en el foco inflamatorio y con esto una de las fases precoces de la inflamación. Ya hay experiencias de actuación positiva sobre esta fase de la inflamación.

Es indudable que la ingeniería genética está permitiendo y permitirá elaborar a escala industrial citoquinas con actividad antiinflamatoria como puede ser la IL-10 o el anticuerpo frente a la IL-1, el IL-1ra. Confío y confiemos que esto será una realidad. Porque ¿quién hubiese dicho hace unos años que hoy se estarían salvando muchas vidas con el empleo terapéutico de los factores de crecimiento hematopoyético? No olvidemos que en la clínica humana hay procesos inflamatorios violentos que interesa «apagar» con la máxima eficacia y prontitud. No olvidemos que estamos en los comienzos de una auténtica y eficaz terapéutica frente a los radicales oxidativos, cuyo papel en la inflamación parece evidente. Por otro lado está el manejo

de inhibidores de la «sintasa» inducible del óxido nítrico —NO—. Ya se empieza a buscar dietas modificadas, manejo dietético, en las que los sustratos de donde proceden las prostaglandinas y los leucotrienos no generan moléculas proinflamatorias. Este planteamiento dietético terapéutico sin duda puede ser eficaz disminuyendo la inflamación de procesos crónicos.

¿Podremos en un futuro actuar sobre la expresión de alguno o algunos de los genes de los factores proinflamatorios? ¿Será posible utilizar una politerapia con varios antiinflamatorios? Recordemos que esta es la actitud que adoptamos frente a la enfermedad cancerosa con la poliquimioterapia y frente a las infecciones con la poliantibioticoterapia o antivírica múltiple, como es el caso del SIDA.

Señores Académicos, Señoras y Señores termino con un mensaje de esperanza. La poderosa investigación que se está realizando en el campo de la terapéutica de la inflamación, en la que juega un papel importante y digno de elogio la industria farmacéutica, nos permite ver, para el bien de los enfermos, un futuro esperanzador y científicamente bien fundamentado en el CAMPO DE LA TERAPIA ANTI-INFLAMATORIA.

He dicho.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gallin JM, Goldstein IM, Snyderman R. Inflammation: basic principles and correlates. 2<sup>a</sup> ed. Raven Press Ltd. New York 1992.
2. Gómez de la Concha E. Células de la inflamación. En Inflamación y enfermedad. Edit. D. Espinós, M. Díaz-Rubio. Pag.13.Ed Medica Panamericana, 1997.
3. Coffman RL et al. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 249:308-310;1989.
4. Enokihara H et al. T cells from eosinophilic patients produce interleukin-5 with interleukin-2 stimulation. *Blood* 73:1809-1813;1989.
5. Haaksma EEJ, Leurs R, Timmerman H. Histamine receptors: subclasses and specific ligands. *Pharmacol Ther* 47:73-104;1990.
6. Resink TJ et al. Histamine-induced phosphoinositide metabolism in cultured human umbilical vein endothelial cells: association with thromboxane and prostacyclin release. *Biochem Biophys Res Commun* 144:438-446;1987.
7. Caporale LH et al. The active site of C3a anaphylatoxin. *J Biol Chem* 225:10758-10763;1980.
8. Chenoweth DE, Ericksen BW, Hugli TE. Human C5a-related synthetic peptides as neutrophil chemotactic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 68:227-231;1979.
9. Dias Da Silva W, Eisele JW, Lepow IH. Complement as a mediator of inflammation. III. Purification of the activity with ana-

phylatoxin properties generated by interaction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C'3. *J Exp Med* 126:1027-1048;1967.

10. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 115:453-466;1962.
11. Rollind BJ. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 2:198-204;1996.
12. Ward PA, Berengerg JL. Defective regulation of inflammatory mediators in Hodgkin's disease: supernormal levels of chemotactic-factor inactivator. *N Engl J Med* 290:76-80;1974.
13. Pérez HD, Andron RI, Goldstein IM. Infection in patients with systemic lupus erythematosus: association with a serum inhibitor of complement (C5)-derived chemotactic activity. *Arthritis Rheum* 22:1326-1333;1979.
14. Yamamoto T, Cochrane CG. Guinea pig Hageman factor as a vascular permeability enhancement factor. *Am J Pathol* 105:164-175;1981.
15. Moskowitz RW et al. Generation of kinin-like agents by chondroitin sulfate, heparin, chitin sulfate and human articular cartilage: possible pathophysiologic implications. *J Lab Clin Med* 76:790-798;1970.
16. Leithauser B et al. Hemostatic abnormalities and the severity of illness in patients at the onset of clinically defined sepsis. Possible indication of the degree of endothelial cell activation? *Intensive Care Med* 22:631-636;1996.
17. Hazuda DJ et al. Processing of precursor interleukin-1 beta and inflammatory disease. *J Biol Chem* 265:6318-6322;1990.
18. Smith J et al. Interleukin-1 alpha: results of a phase I toxicity and immunomodulatory trial. *Am Soc Clin Oncol* 9:717;1990.
19. Groves RW et al. Inflammatory and hiperproliferative skin disease in mice that express elevated levels of the IL-1 receptor (type I) on epidermal keratinocytes. Evidence that IL-1-induci-

- ble secondary cytokines produced by keratinocytes in vivo can cause skin disease. *J Clin Invest* 98:336-344;1996.
20. Barnes PS, Kaim M. Mechanism of disease: nuclear factor-KB. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med* 336:1066-1071;1997.
  21. Fibbe WE, Falkenburg JHF. Regulation of hematopoiesis by interleukin-1. *Biotherapy* 1:263-276;1990.
  22. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627-1652;1991.
  23. Cominelli F. Specific mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) in IBD: a potential mechanism of chronic inflammation. *Immunol, Microbiol and Inflammatory Dis.* A667;1994.
  24. Castell JR et al. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS lett* 232:347-350;1988.
  25. Wognum AW, van Gils FC, Wagemaker G. Flow cytometric detection of receptors for interleukin-6 on bone marrow and peripheral blood cells of humans and rhesus monkeys. *Blood* 81:2026-2043;1993.
  26. Waltz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 149:755-761;1987.
  27. Gregory H et al. Structure determination of a human lymphocyte derived neutrophil activating peptide (LYNAP). *Biochem Biophys Res Commun* 151:883-890;1988.
  28. Fiorentino DF et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol* 147:3815-3822;1991.
  29. Moore KW et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11:165-190;1993.
  30. Niiro H et al. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 89:1621-1628;1997.



31. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 316:379-385;1987.
32. Asher A, Muller JJ, Reichert. Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. *J Immunol* 138:963-974;1987.
33. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 77:110-117;1996.
34. Dinarello CA, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin. *J Exp Med* 163:1433-1450;1986.
35. Nadel S et al. Variation in the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis* 174:878-880;1996.
36. Flower RJ, Moncada S, Vane RJ. Analgesic antipyretics and antiinflammatory agents: drugs employed in the treatment of gout. Cap. 29 de *The Pharmacological basis of therapeutics*. Edit Godman and Gilman, 6<sup>a</sup> ed. Macmillan 1980.
37. Vane RJ. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. *Nature* 231-232;1971.
38. Kurzkok R, Lieb CC. Biochemical studies of human semen-II. The action of semen on the human uterus. *Proc Soc Exp Biol Med* 28: 268;1930.
39. Goldblatt MW. Properties of human seminal fluid. *J Physiol* 84:208;1935.
40. Samuelsson B. Biosynthesis of prostaglandins. *Fed Proc* 31:1442;1972.
41. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxane: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci* 72:2994;1975.
42. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane RJ. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxide to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663;1976.

43. Nugteren D.H. Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. *Biochem Biophys Acta* 380:299;1975.
44. Fu J-Y et al. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (ciclooxigenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 265:16737-16740;1990.
45. Raz A et al. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J Biol Chem* 263:3022-3028;1988.
46. Hayek MG. Enhanced expression of inducible cyclooxygenase with age in murine macrophages. *The Journal of Immunology* 159:2445-2451;1997
47. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Semin Arthritis Rheum* 26:2-10;1997.
48. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol* 24:15-19;1997.
49. Anderson GD. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 97:2672-2679;1996.
50. Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Pain and inflammatory mediators. En: Van JR, Ferreira SH, eds. *Handbook of experimental pharmacology*, vol 50/1. New York: Springer-Verlag, 588-617;1978.
51. Ford-Hutchinson AW et al. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286:264-265;1980.
52. Radmark O et al. Leukotriene A4 hydrolase in human leukocytes: purification and properties. *J Biol Chem* 259:12339-12345;1984.
53. Yoshimoto T et al. Properties of highly purified leukotriene C4 synthase of guinea pig lung. *J Clin Invest* 81:866-871;1988.
54. Lam BK et al. The identification of a distinct export step following the biosynthesis of leukotriene C4 by human eosinophils. *J Biol Chem* 264:12885-12889;1989.
55. Taylor GW et al. Urinary leukotriene E4 after antigen challenge and in acute asthma and allergic rhinitis. *Lancet* 1:584-588;1989.

56. Smith LJ. Leukotrienes in asthma. The potential therapeutic role of antileukotriene agents. *Arch Intern Med* 156:2181-2189;1996.
57. Chung KF. Platelet activating factor revisited. *Thorax* 52:1019-1020;1997.
58. Miwa M et al. Characterization of serum platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase. Correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. *J Clin Invest* 82:1983-1991;1988.
59. Shindo K, Koide K, Fukumura M. Enhancement of leukotriene B4 release in stimulated asthmatic neutrophils by platelet activating factor. *Thorax* 52:1024-1029;1997
60. Hendel J, Nielsen OH. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 92:1170-1173;1997.
61. Schreiber S et al. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory Bowel disease. *Gastroenterology* 108:1434-1444;1995.
62. Kucharzik T et al. Synergistic effect of immunoregulatory cytokines on peripheral blood monocytes: potential therapeutic approach. *Immunology, Microbiology and Inflammatory Disorders* A943;1996.
63. Krumm PJJM et al. Tumor necrosis factor-alpha concentrations in whole gut lavage fluid do not represent disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 110;942;1996.
64. Kikawa Y et al. Urinary leukotriene E4 after exercise challenge in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 89:1111-1119;1992.
65. Farmacologia de la inflamación.- Lewis RA, Austen KF. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, Metabolism, Receptors, Functions and Pharmacology. *J Clin Invest* 73;889-897;1984.
66. Adkins JC, Brogden RN. Zafirlukast. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of asthma. *Drugs* 55:121-144;1998.

67. Spence DPS et al. The effect of the orally active platelet-activating factor antagonist WEB 2086 in the treatment of asthma. *Am J Respir Crit Car Med* 149:1142-1148;1994.
68. Roodman GD. Perspectives Interleukin-6: An osteotropic factor? *J Bone Miner Res* 7:475-478;1992.
69. Miossec P et al. Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37:1715-1722;1994.
70. Bauer DC. Aspirin and NSAID use in older women: effect on bone mineral density and fracture risk. *J Bone Miner Res* 11:29-35;1996
71. Garcia C et al. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 11:1619-1627;1996
72. Kotake S et al. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res* 11:88-95;1996.
73. Ralston SH et al. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res* 10:1040-1049;1995.
74. Rico Lenza H. Osteoporosis. En *Tratado de Medicina Interna*. Edits. M. Díaz-Rubio, D. Espinós. 2862-2870. Ed Medica Panamericana. 1994.
75. Matsuura T et al. Immune activation gene products are resistant to IL-4 inhibitory activity in Crohn's disease (CD). *Immunology, Microbiology and Inflammatory Disorders* A739:1993.
76. Singh J, Hamid R and Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of Dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Research* 57:3465-3470;1997.
77. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms 14:436-441;1993.

78. Yang YH et al. Exacerbation of adjuvant arthritis by adrenalectomy is associated with reduced leukocyte lipocortin 1. *J Rheumatol* 24:1758-1764;1997.
79. Pitzalis C et al. Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion. And additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect. *The Journal of Immunology* 158:5007-5016;1997.
80. Vane J.R. Conferencia Plenaria XI Congreso de la Sociedad Española de Arterioesclerosis. Cádiz. Octubre 1998.
81. Vane J.R. Nuevos mecanismos de acción de los antiinflamatorios no esteroideos. En nuevas perspectivas en el tratamiento antiinflamatorio. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología. Zaragoza 1996.
82. Lizasoai I, Leza JC, Moro MA, Lorenzo P. Los fármacos en el control de la inflamación. Nuevas perspectivas de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos. En «Inflamación y Enfermedad». Edit. D. Espinós, M. Díaz-Rubio. Pag 171. Edit Médica Panamericana. 1997.
83. Brater CD. Drug-Drug and Drug-disease interaction with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med* 80:62-77;1986.
84. Reuter BK, Davies NM, Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria and enterohepatic circulation. *Gastroenterology* 112:109-117;1997.
85. Suzuki YJ, Packer L. Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by vitamin E derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 193:277-283;1993.
86. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.*12:2005-2015;1993.
87. Portanova JP, et al. Selective neutralization of prostaglandin E<sub>2</sub> blocks inflammation, hyperalgesia and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med* 184:883-891;1996.

88. Albert DH et al. Pharmacology of ABT-491, a highly potent platelet-activating factor receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 325:69-80;1997.
89. Merlos M et al. Rupatadine, a new potent, orally active dual antagonist of histamine and platelet-activating factor (PAF). *J Pharmacol Exp Ther* 280:114-121;1997.
90. Murthy S et al. The efficacy of BAY and 1015 in dextran sulfate model of mouse colitis. *Inflamm Res.* 46:224-233;1997.
91. Leff JA et al. Montelukast, un antagonista de los receptores de leucotrienos, para el tratamiento del asma leve y la broncoconstricción inducida por el ejercicio. *N Engl J Med* 339:147-152;1998.