

Atrapadores de glutamato plasmático en ictus isquémico

¹J Brea¹, ²J Castillo, ¹MI Loza.

¹Grupo de investigación Biofarma. Departamento de Farmacología. Centro de Investigación CIMUS. Universidad de Santiago de Compostela. ²Laboratorio de Investigación de Neurociencia Clínica. Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela.

Presentación

El presente trabajo muestra un trabajo de farmacología traslacional sobre el reposicionamiento de la riboflavina para el tratamiento de ictus isquémico. Parte de una hipótesis terapéutica procedente de observaciones clínicas y mediante farmacología experimental se identifica un nuevo uso para riboflavina que se utiliza para validar clínicamente un nuevo mecanismo de acción para el tratamiento de esta patología.

Resumen

El ictus isquémico presenta una alta incidencia a nivel mundial con un importante deterioro de la calidad de vida de los pacientes. Uno de los principales factores de la muerte neuronal que se produce tras una enfermedad isquémica cerebral es la excitotoxicidad inducida por un exceso de glutamato cerebral. Una de las estrategias propuestas para reducir este daño se basa en reducir los niveles plasmáticos de glutamato para inducir un descenso de los niveles cerebrales de glutamato. En este trabajo se describe cómo a partir de resultados de farmacología in vitro se ha identificado a la riboflavina como un compuesto capaz de reducir los niveles de glutamato. El posible efecto terapéutico se confirmó en modelos animales de ictus isquémico observándose un descenso de los niveles de glutamato y mejoras en el área infartada. En base a estas evidencias se llevó a cabo un ensayo clínico de prueba de concepto donde se demostró que el tratamiento con riboflavina tras un ictus isquémico indujo un descenso de los niveles plasmáticos de glutamato y una tendencia a una mejora del déficit neurológico.

En conclusión, este estudio traslacional demostró por primera vez la utilidad de los atrapadores plasmáticos de glutamato en pacientes de ictus isquémico.

Palabras clave

Atrapadores de glutamato, ictus isquémico, riboflavina, GOT, prueba de concepto clínica, reposicionamiento de fármacos.

Conflicto de intereses

Este artículo no presenta conflicto de interés.

Summary

PLASMA GLUTAMATE GRABBERS IN ISCHEMIC STROKE

Ischemic stroke has a high global prevalence with an important decline in patient's life quality. One of the major players in the neuronal death observed after the ischemic injury is glutamate-induced excitotoxicity due to the high brain glutamate levels. A strategy for reducing this injury is based on decreasing plasma glutamate levels for inducing a decrease in the brain glutamate levels. This work describes the in vitro discovery that riboflavin was able to decrease glutamate levels. The putative therapeutic effect was confirmed in ischemic stroke animal models where a decrease in glutamate levels and improvement in the ischemic region were observed. Based on these evidences a proof-of-concept clinical trial was carried out demonstrating that riboflavin treatment after the ischemic stroke led to a decrease of plasma glutamate levels, as well as a trend to a neurological improvement.

In summary, this translational work demonstrates for first time the usefulness of plasma glutamate grabbers in ischemic stroke patients

Key words

Glutamate traps, ischemic stroke, riboflavin, GOT, clinical proof of concept, drug repositioning.

Conflict of interests

This article does not present a conflict of interest.

Necesidades clínicas en ictus isquémico

Aunque las mejoras en atención primaria y hospitalaria han reducido la mortalidad asociada con el ictus isquémico su incidencia resulta todavía muy elevada (1,2), por lo que existe una clara necesidad médica de paliar el daño cerebral tras el episodio isquémico y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

El ictus isquémico es el resultado de la interrupción de riego sanguíneo en el cerebro, donde la región isquémica se divide en un núcleo y en un área de penumbra (3), siendo el núcleo la zona con una isquemia intensa que si es prolongada puede conllevar la necrosis neuronal y de la glía (4). El área de penumbra se refiere al tejido adyacente al núcleo en el que existe una hipoperfusión, pero la perfusión es suficiente para preservar la función de los canales iónicos y por tanto las células permanecen viables durante varias horas. Sin embargo, si no se recupera el flujo cerebral esta zona tras pocas horas después del episodio vascular aparecerá la muerte celular. Por tanto, esta área de penumbra es la zona donde hay una mayor probabilidad de llevar a cabo intervenciones farmacológicas positivas.

Hasta la fecha el único tratamiento aprobado para recuperar la irrigación de la zona de penumbra es la inyección intravenosa de activador de plasminógeno tisular (t-PA) entre las primeras cuatro horas y media horas y la trombectomía mecánica tras el ictus isquémico (5,6), este pequeño margen de tiempo para observar el efecto terapéutico limita su aplicación a un reducido número de pacientes.

La excitotoxicidad del glutamato en el ictus isquémico

La concentración extracelular de glutamato se regula de forma muy precisa por medio de transportadores dependientes de sodio (7) presentes en astrocitos que recaptan el glutamato para su reciclado. Además, estos transportadores también se expresan en células endoteliales de capilares cerebrales que almacenan el glutamato y posteriormente permiten la transferencia del glutamato hacia la sangre mediante difusión facilitada (8,9).

La falta de aporte de nutrientes celulares que aparece tras un episodio isquémico conlleva una despolarización neuronal, lo que conduce a una liberación masiva de glutamato al espacio extracelular sin que pueda ser recaptado por astrocitos o células endoteliales debido, precisamente, a la falta de aporte energético. De este modo, tras un episodio cerebrovascular se alcanzan concentraciones de glutamato extracelular muy eleva-

das (en el rango de milimolar) que inducen una sobreexcitación de receptores NMDA y AMPA/kainato induciendo un efecto excitotóxico no sólo a nivel neuronal, sino también en astrocitos, oligodendrocitos, pericitos y células endoteliales (10).

En estudios clínicos en pacientes de ictus isquémico se demostró que los niveles de glutamato son críticos en el daño neuronal, mostrando en el momento de la admisión niveles de glutamato plasmático y en el líquido cefalorraquídeo más elevados que individuos control (11). Los niveles plasmáticos de glutamato se plantearon como predictivos de la progresión del daño neuronal a las 48 horas. Así, cuando las concentraciones plasmáticas de glutamato fueron superiores a 200 μM la sensibilidad de predicción de este daño fue del 85% y la especificidad fue del 97% (12).

Todas estas evidencias sugieren un papel crítico del glutamato en la progresión del ictus isquémico y suponen una fuente de nuevas estrategias neuroprotectoras basadas en la disminución de esta excitotoxicidad.

Atrapadores del glutamato plasmático

En condiciones fisiológicas existe un gradiente de concentraciones entre el glutamato plasmático (40-60 μM) y el cerebral (1-10 μM). Así, cuando hay un incremento del glutamato extracelular los niveles se ven reducidos por su transporte a los astrocitos y a las células endoteliales. En el momento en que la concentración de glutamato en las células endoteliales es superior a la plasmática, el glutamato se transporta a la sangre por medio de un mecanismo de difusión facilitada. Basándose en este mecanismo, si se disminuyen los niveles plasmáticos de glutamato se modificaría este gradiente favoreciendo la salida del glutamato cerebral y por tanto reduciendo sus efectos neurotóxicos.

Para demostrar este mecanismo de acción se propone como atrapador del glutamato la glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT), una enzima presente en la sangre que, en presencia de oxalacetato, transforma el glutamato en alfa-cetoglutarato y aspartato. Así, cuando se incrementa la concentración de oxalacetato el equilibrio se desplaza induciendo un descenso del glutamato. Este efecto se confirmó en animales de experimentación tanto mediante estudios de microdiálisis como con glutamato radiactivo (13, 14)

El efecto neuroprotector del oxalacetato se ha demostrado en distintos modelos animales, como en ratas sometidas a lesiones fototrombóticas o en modelos de isquemia inducidos por oclusión transitoria de la arteria cerebral media (15, 16).

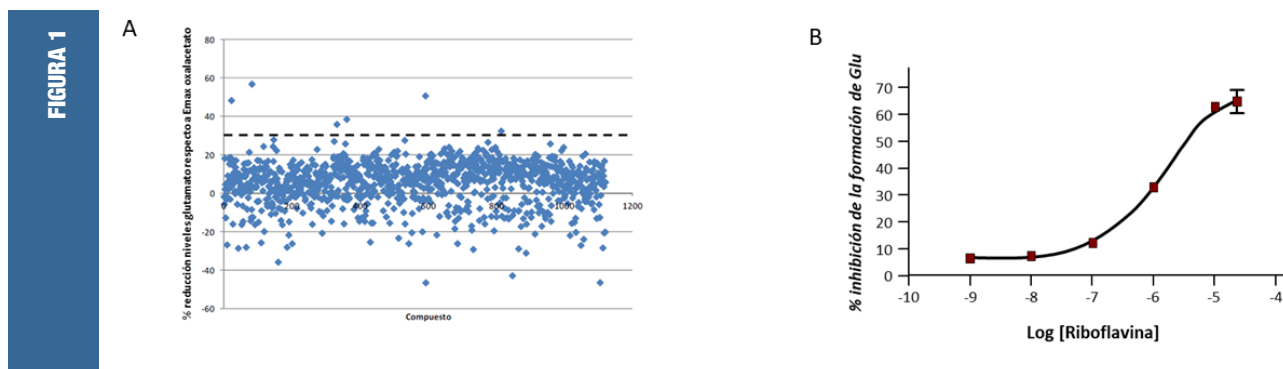


Figura 1. Identificación in vitro de la riboflavina. A) Actividad de los compuestos sobre GOT para reducir la formación de glutamato. La línea punteada muestra el punto de corte para la definición de hits. B) Curva concentración-respuesta de riboflavina para la reducción de los niveles de glutamato plasmático.

TABLA 1	Compuesto	Emax (Inhibición máxima de la formación de glutamato)	IC50 (µM)	Emax (Inhibición de succinato deshidrogenasa)	IC50 (µM)
	R(-) apomorfina	80.20±0.70	58.1	81.37±4.16	6.2
Nifedipina	54.46±1.77	-	58.88±10.57	-	
L(-) metildopa	55.71±1.77	117	35.51±1.32	-	
Dobutamina	43.18±0.71	81.7	50.98±5.55	-	
Riboflavina	60.32±6.19	1.96	39.22±2.77	10.8	
Doxiciclina	52.06±2.68	15.1	-	-	

Tabla 1. Valores de potencia (EC_{50}) y de eficacia (Emax) de los compuestos sobre la actividad de GOT y de succinato deshidrogenasa.

Sin embargo, el uso del oxalacetato como un atrapador de glutamato plasmático se ve limitado por las elevadas dosis que habría que emplear en pacientes para observar efectos similares a los observados en animales. Estas concentraciones inhibirían la succinato-deshidrogenasa que participa tanto en el ciclo del ácido cítrico como en el ciclo de Krebs lo que impide su uso en humanos con seguridad, por lo que se hace necesaria la identificación de nuevas moléculas que modulen la actividad de la GOT para reducir el glutamato plasmático.

Identificación in vitro de atrapadores de glutamato plasmático

Para identificar nuevos atrapadores de glutamato plasmático se llevó a cabo una estrategia de reposicionamiento de fármacos, donde se estudió el efecto de una colección de 1120 fármacos (Prestwick® chemical collection) aprobados sobre la actividad de la GOT humana. El cribado de estos fármacos permitió identificar 6 compuestos que redujeron la concentración de glutamato en presencia de GOT. Para confirmar su efecto sobre la GOT se estudió la actividad de estos hits mediante la construcción de curvas concentración-respuesta, presentando cinco de ellos un efecto dependiente de la concentración, siendo la vitamina B2 (riboflavina) el que mostró una mayor potencia para reducir los niveles de glutamato con una IC_{50} de 1.96 µM (Figura 1, Tabla 1).

FIGURA 2

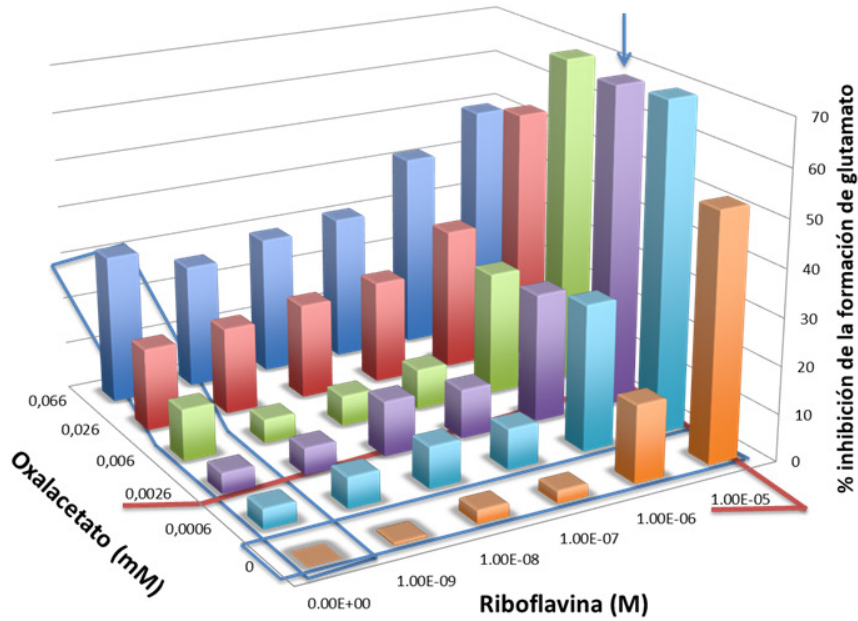


Figura 2. Efecto de distintas concentraciones de riboflavina sobre distintas concentraciones de oxalacetato en la reducción de los niveles de glutamato inducida por GOT.

FIGURA 3

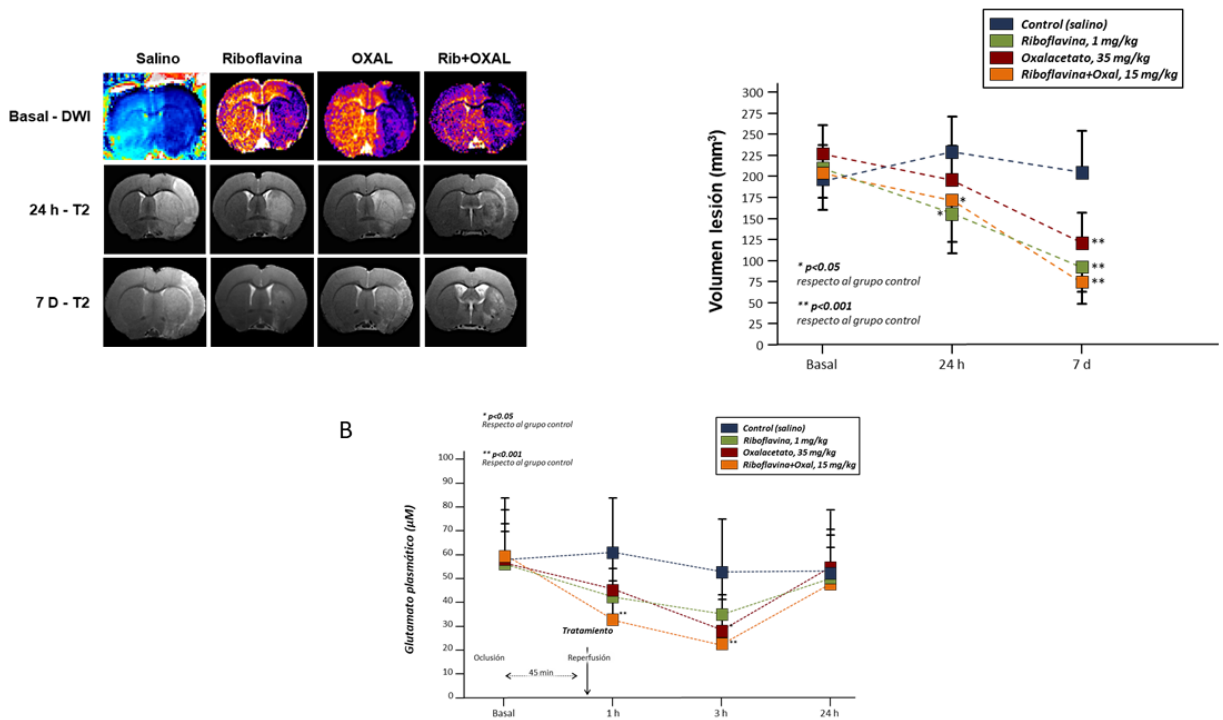


Figura 3. Efecto a distintos tiempos tras la administración de riboflavina (1 mg/Kg, 10 mg/Kg, 50 mg/Kg) y oxalacetato (35 mg/Kg) sobre los niveles de glutamato plasmático en ratas Sprague-Dawley macho sanas.

En base al efecto observado del oxalacetato en la succinato-deshidrogenasa, se evaluó la potencia de los hits para inhibir esta enzima, observándose que la riboflavina presentó una buena ventana terapéutica con una selectividad superior a 10 veces frente

a la potencia observada para reducir los niveles de glutamato plasmático (Tabla 1).

Dado que la riboflavina redujo en menor extensión que el oxalacetato los niveles de glutamato plasmá-

tico se estudió el efecto mediado por la combinación entre ambos compuestos, observándose que existía una sinergia aditiva entre la riboflavina y el oxalacetato que incrementaba el efecto de ambos compuestos a concentraciones a las que ninguno de los dos inhibe la succinato deshidrogenasa (Figura 2).

En base a la potencia observada y a la buena selectividad de la riboflavina, se seleccionó este compuesto para su estudio en modelos animales de ictus isquémico que permitieran validar su uso como atrapador de glutamato plasmático.

Validación in vivo de atrapadores de glutamato plasmático para su uso en infarto isquémico

Previamente, se estudió el efecto de la riboflavina sobre los niveles de glutamato en animales sanos, observándose que tras la administración intravenosa en ratas a 3 dosis diferentes (1, 10 y 50 mg/kg) había una reducción de los niveles de glutamato plasmático a las 2 y a las 4 horas tras la administración similares a las observadas tras la administración del oxalacetato a 35 mg/kg. Sin embargo, a las dosis de 1 y 50 mg/kg se observaron reducciones en los niveles de glutamato plasmático superiores a las obtenidas por oxalacetato a los 30 minutos tras la administración, observándose el efecto máximo a las 2 horas tras la administración. La falta de un efecto dependiente de la dosis llevó a seleccionar la concentración más baja (1 mg/kg) para el estudio en modelos animales isquémicos (17).

La riboflavina se administró a ratas en las que se indujo el infarto mediante la oclusión de la arteria cerebral media 1 hora después de la inducción de la isquemia y tras la reperusión de la arteria. Mediante la obtención de imágenes de resonancia magnética se observó que tanto los animales tratados con oxalacetato como los tratados con riboflavina mostraron una reducción del área infartada a las 24 horas tras el tratamiento, además de una reducción en los niveles de glutamato plasmático a las 3 horas tras la oclusión de la arteria con respecto a animales no tratados (Figura 3).

Por otro lado, se comprobó que el tratamiento con riboflavina no indujo ninguna modificación en ratas en las que se indujo una hemorragia intracerebral, lo cual permite su administración previa, antes del diagnóstico por imagen para discriminar entre ictus isquémico e ictus hemorrágico (17).

Prueba de concepto clínica de atrapadores de glutamato plasmático en el tratamiento de ictus isquémico

El hecho de que la riboflavina fuese un fármaco usado en humanos con una formulación similar a la utilizada en los ensayos en animales de experimentación para la administración en un bolo intravenoso (Vitamin B2, Streuli) permitió la realización de un ensayo clínico de prueba de concepto en pacientes de ictus isquémico. Éste fue un ensayo intervencional unicéntrico aleatorizado y doble ciego de 18

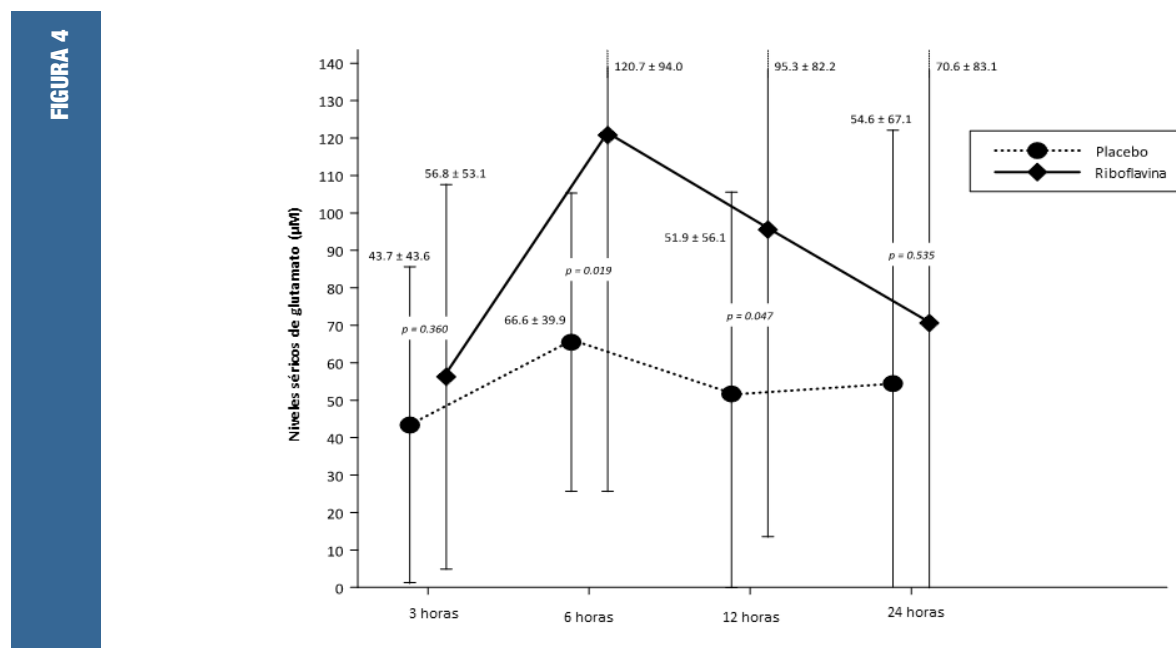


Figura 4. Efecto de la administración de riboflavina (1 mg/Kg), oxalacetato (35 mg/Kg) y la combinación de ambos en ratas Sprague-Dawley en las que se indujo una isquemia por oclusión de la arteria cerebral media sobre: A) tamaño de la región infartada y B) niveles de glutamato plasmático.

meses llevado a cabo en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (NCT02446977). En el ensayo se enrolaron un total de 50 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y bien ellos mismos o bien sus familiares firmaron el consentimiento informado. Los pacientes se asignaron bien a un grupo placebo (25 pacientes) a los que se administró un bolo de 4 ml de suero salino o a un grupo tratado (25 pacientes) a los que se administraron 20 mg de riboflavina en un bolo de 4 ml. Ambos grupos fueron tratados con t-PA siguiendo la práctica clínica habitual. En todos los pacientes se determinaron los niveles séricos de glutamato en el momento de la administración y a las 3, 6, 12 y 24 horas después.

Se observó un descenso en los niveles plasmáticos de glutamato a las 12 horas tras la administración que fue superior en el grupo tratado con riboflavina a la observada en el grupo de placebo (Figura 4). Aunque el tamaño muestral tan reducido no permitió observar diferencias significativas, se observó una mayor mortalidad en el grupo placebo que en el grupo control, así como una mejoría en las escalas de evaluación NIHSS y mRS (17), lo que apoya la realización de un estudio en Fase III para validar esta nueva aproximación terapéutica.

Conclusión

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de que la riboflavina reduce de forma segura los niveles de glutamato plasmático y muestra una tendencia hacia una mejor evolución clínica y estado funcional a los 3 meses del accidente isquémico.

Referencias

- Howard, G.: Population shifts and the future of stroke: forecast of the future burden of stroke. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012; 1268: 14-20.
- Feigin, V.L.; Forouzanfar, M.H.; Krishnamurthi, R.; Mensah, G.A.; Connor, M.; Bennett, D.A.; Moran, A.E.; Sacco, R.L.; Anderson, L.M.; Truelsen, T.; O'Donnell, M.; Venketasubramanian, N.; Barker-Collo, S.; Lawes, C.M.; Wang, W.; Shinohara, Y.; Witt, E.; Ezzati, M.; Naghavi, M.; Murray, C; on behalf of the Global Burden of Diseases, Injuries, Risk Factors Study 209109 (GBD2010) and the GBD Stroke Experts group: Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2014; 383: 245-254.
- Appireddy, R.M.; Demchuck, A.M.; Goyal, M.; Menon, B.K.; Eesa M.; Choi, P; Hill, M.D. Endovascular therapy for ischemic stroke. *Journal of Clinical Neurology*, 2015; 11: 1-8.
- Heiss, W.D. and Rosner, G. Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. *Annals of Neurology*, 1983; 14: 294-301.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine*, 1995; 333: 1581-1587.
- Hacke, W.; Kaste, M.; Bluhmki, E.; Brozman, M.; Dávalos, A.; Guidetti, D.; Larrue, V.; Lees, K.R.; Medeghri, Z.; Machnig, T.; Schneider, D.; von Kummer, R; Wahlgren, N.; Toni, D.; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine*, 2008; 359: 1317-1329.
- Danbolt, N.C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 2001; 65: 1-105.
- O'Kane, R.L.; Martínez-López, I.; DeJoseph, M.R.; Viña, J.R.; Hawkins, R.A. Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2 and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274: 31891-31895.
- Jia, M.; Njapo, S.A.N.; Rastogi, V.; Hedna, V.S. Taming glutamate excitotoxicity: strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs*, 2015; 29: 153-162.
- Castillo, J.; Loza, M.I.; Mirelman, D.; Brea, J.; Blanco, M.; Sobrino, T.; Campos, F. A novel mechanism of neuroprotection: blood glutamate grabber. *Journal of Cerebral Blood and Flow Metabolism*, 2016; 36: 292-301.
- Ogden, K.K.; Traynelis, S.F. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2011; 32: 726-733.
- Castillo, J.; Dávalos, A.; Noya, M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet*, 1997; 349: 79-83.
- Ikonomidou, C.; Turski, L. Why did NMDA receptor antagonist fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury?. *Lancet Neurology*, 2002; 1: 383-386.
- Teichberg, V.I.; Cohen-Kashi-Malina, K.; Cooper, I.; Zlotnik, A. Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience*, 2009; 158: 301-308.
- Nagy, D.; Marosi, M.; Kis, Z.; Farkas, T.; Rakos, G.; Vecsei, L.; Teichberg, V.I.; Toldi, J. Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex. *Cell Molecular Neurobiology*, 2009; 29: 827-835.
- Campos, F.; Sobrino, T.; Ramos-Cabrer, P.; Argibay, B.; Agulla, J.; Pérez-Mato, M.; Rodríguez-González, R.; Brea, D.; Castillo, J. Neuroprotection by glutamate oxaloacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study. *Journal of Cerebral Blood and Flow Metabolism*, 2011; 31: 1378-1386.
- Da Silva-Candal, A.; Pérez-Díaz, A.; Santamaría, M.; Correa-Paz, C.; Rodríguez-Yáñez, M.; Ardá, A.; Pérez-Mato, M.; Iglesias-Rey, R.; Brea, J.; Azuaje, J.; Sotelo, E.; Sobrino, T.; Loza, M.I.; Castillo, J.; Campos, F. Clinical validation of blood/brain glutamate grabbing in acute ischemic stroke. *Annals of Neurology*, 2018; 84: 260-273.