

DONACION

Nº Reg. 028710

Catalogador [Signature]

Fecha 17/2/2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE MEDICINA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA ENTRE EL
ANTAGONISTA MUSCARÍNICO BENZOTROPINA Y LA
TEOFILINA EN EL MODELO DE CATALEPSIA INDUCIDA CON
HALOPERIDOL**

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B. OLGA EDITH GONZÁLEZ LUGO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA ESTHER JIMÉNEZ CATAÑO

ASESORES:

DRA. MARÍA DEOGRACIAS ORTIZ PÉREZ

DR. FLAVIO MARTÍNEZ MORALES

ASESOR EXTERNO:

DR. JOSÉ LUIS GÓNGORA ALFARO

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

JULIO 2007



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE MEDICINA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA ENTRE EL
ANTAGONISTA MUSCARÍNICO BENZOTROPINA Y LA
TEOFILINA EN EL MODELO DE CATALEPSIA INDUCIDA CON
HALOPERIDOL

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B. OLGA EDITH GONZÁLEZ LUGO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA ESTHER JIMÉNEZ CATANO

ASESORES:

DRA. MARÍA DEOGRACIAS ORTIZ PÉREZ

DR. FLAVIO MARTÍNEZ MORALES

DR. JOSÉ LUIS GÓNGORA ALFARO



le

María Esther Jiménez Cataño

Flavio Martínez Morales

José Luis Góngora Alfaro

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

JULIO 2007

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA ESTHER JIMÉNEZ CATAÑO.

FINANCIADA CON RECURSOS DEL PROYECTO SEP-CONACYT 2004 CO1-47763 OTORGADO AL DR. J. L. GÓNGORA ALFARO, C06-FAI-11-10.47 ASIGNADO A LA DRA. M.E. JIMÉNEZ CATAÑO Y PIFI 3.1 DE LA UASLP. LA AUTORA RECIBIÓ LA BECA DE MAESTRÍA DEL CONACYT 191549.

DEDICATORIA

A la pareja de personas que me regalaron la vida y me enseñaron a caminar en ella, me inculcaron valores y las enseñanzas mas cimentadas con las que cuento, quienes han fungido como los principales guías de mi camino Olga Lugo y Tomás González

A mis hermanos Karen, Iván, Dinora, Ángel y Eric González. Por todo su cariño, travesuras, enojos, alegrías, diversión y apoyo incondicional.

A Alma Ibarra, Ángel Vértiz, Laura Martínez, Esperanza Márquez, Ramón Zapata, Alicia Alonso y Edward Montelongo. Por vivir conmigo esta experiencia tan enriquecedora y por todos los momentos de alegría compartidos.

Al creador de esta vida por poner en mi camino gente tan valiosa y experiencias de las cuales aprender.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. María Esther Jiménez, María Deogracias Ortiz, Flavio Martínez, José Luis Góngora, Roberto González, por su comprensión y apoyo en los momentos complicados que se presentaron en la realización de mis estudios de maestría.

A cDr Sergio Zarazúa, MC Juan Manuel Delgado, cMC Rosalva Ríos, QFB María de la Luz Martínez e ICS Germán Torres porque fueron un bloque fundamental para que hoy se vea culminada esta tesis.

A mis excompañeras Nadia García, Fátima Ceballos y Amida Juárez, mis compañeras Sonia Castillo y Melisa Bocanegra por su compañía, su amistad y colaboración. A las Sras. Brígida y Mercedes porque sus servicios también son importantes.

Al Sr. Severo Fernández e Ing. Julián Espinosa por creer en mí y por las gratas enseñanzas que obtuve de convivir con ustedes.

A CONACYT por la beca otorgada que sin ella hubiera sido imposible realizar este proyecto.

Estudio de la Interacción Farmacológica entre el Antagonista Muscarínico Benzotropina y la Teofilina en el Modelo de Catalepsia Inducida con Haloperidol

González-Lugo OE¹, Jiménez-Capdeville ME¹, Góngora-Alfaro JL^{2*}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

² Departamento de Neurociencias, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán.

***Autor correspondiente.**

Laboratorio de Neurofisiología

Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi"

Universidad Autónoma de Yucatán

Avenida Itzaes No. 490

C.P. 97000, Mérida, Yucatán, México.

Fax +52(999) 923 61 20

e-mail: galfaro@uady.mx

RESUMEN

El primer blanco no-dopaminérgico para aliviar los síntomas de la enfermedad de Parkinson (EP) lo constituyeron los antagonistas muscarínicos de acción central, los cuales pueden corregir el desbalance entre los sistemas dopaminérgico y colinérgico generado en la EP, debido a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, los efectos adversos que producen a dosis terapéuticas limitan su uso, por lo que actualmente se investigan alternativas que sustituyan al bloqueo de los receptores postsinápticos para corregir la estimulación excesiva que las interneuronas colinérgicas ejercen sobre las neuronas gabaérgicas estriatales en la EP. La cafeína y la teofilina han mostrado efectos benéficos en modelos animales de la EP, ya que al bloquear los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} , modulan la liberación de acetilcolina. **Objetivo.** Conocer el efecto de la administración conjunta de benzotropina (BZT), un antagonista de los receptores muscarínicos, y la teofilina (TEO) sobre la catalepsia inducida con haloperidol en la rata. **Metodología:** Se midió el curso temporal de la catalepsia. Los tratamientos administrados fueron: vehículo (agua desionizada, 1 ml/kg); teofilina (0.928 y 1.856 mg/kg) + vehículo; benzotropina (0.134 y 0.268 mg/kg) + vehículo; la combinación a dosis baja (TEO 0.928 + BZT 0.134 mg/kg); y a dosis alta (TEO 1.856 + BZT 0.268 mg/kg). La catalepsia se evaluó a intervalos de 15 minutos durante 5.5 horas colocando las patas anteriores de las ratas sobre una barra metálica horizontal situada a 9 cm de altura y midiendo el tiempo de descenso de las extremidades hacia el piso. **Resultados.** La administración de las dos dosis de teofilina no produjo efecto sobre la catalepsia, mientras que la administración de benzotropina (0.268 mg/kg) produjo una disminución en el tiempo de descenso acumulado comparado con el grupo control. La combinación de los fármacos a los dos niveles mostró una disminución mayor del tiempo de descenso acumulado, la cual fue altamente significativa ($P < 0.001$ comparado con los fármacos individuales y el control, a ambas dosis). **Conclusión.** Dosis bajas de teofilina por sí mismas tienen escasos efectos sobre la conducta cataléptica, pero sí son capaces de aumentar el efecto de la benzotropina, mostrando así la existencia de un sinergismo. Los resultados apoyan la realización de más estudios acerca del uso

de la teofilina como un adyuvante en la terapia con antagonistas muscarínicos en EP.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, adenosina, teofilina, benzotropina, catalepsia, acetilcolina.

INTRODUCCIÓN

El enfoque terapéutico actual para aliviar los síntomas de la enfermedad de Parkinson (EP) se dirige principalmente hacia la búsqueda de blancos no-dopaminérgicos dentro del estriado y de otros elementos del circuito de los ganglios basales. Se han ensayado agentes terapéuticos potenciales, incluyendo fármacos que actúan a través de los receptores glutamatérgicos, cannabinoides, opioides, receptores alfa-2 adrenérgicos, nicotínicos y muscarínicos. Estos fármacos tienen efectividad como antiparkinsonianos con ausencia de algunos de los efectos colaterales actualmente encontrados durante el manejo de la enfermedad a largo plazo mediante L-DOPA y agonistas dopaminérgicos (Jenner, 2003). Además, diversas estrategias empleando agentes neuroprotectores y neurorestauradores, así como la terapia génica, comienzan a introducirse en pacientes y en modelos animales de la EP. Estas terapias, que incluyen agentes antioxidantes, antiapoptóticos, enzimas de síntesis de neurotransmisores y factores de crecimiento, entre otras, pretenden evitar el progreso de la enfermedad dirigiéndose precisamente hacia los factores que precipitan la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Wu y Frucht, 2005).

El primer blanco no-dopaminérgico cuya efectividad se encuentra ampliamente demostrada lo constituyeron los antagonistas muscarínicos de acción central tales como el trihexifenidilo, la benzotropina, la etopropazina y el biperideno. Los anticolinérgicos pueden corregir el desbalance entre los sistemas dopaminérgico y colinérgico generado en la EP, debido a que reducen el grado de neurotransmisión mediada por la acetilcolina estriatal (Brocks, 1999). La benzotropina además, tiene la capacidad de inhibir la recaptura de dopamina favoreciendo su disponibilidad. Se usan como monoterapia en los estadios tempranos de la enfermedad, por lo que son útiles para retrasar la necesidad de prescribir L-DOPA, además de actuar de manera sinérgica con ésta, en estados más avanzados (Deleu *et al.*, 2002). Debido a que a dosis terapéuticas los anticolinérgicos pueden producir amnesia, daño cognitivo y exacerbar el síndrome frontal subcortical asociado a la EP (Moo-Puc *et al.*, 2003), se investigan actualmente alternativas que sustituyan al bloqueo de los receptores

postsinápticos para corregir la estimulación excesiva que las interneuronas colinérgicas ejercen sobre las neuronas gabaérgicas estriatales en la EP. En este contexto, se han identificado blancos presinápticos con un gran potencial terapéutico. La acetilcolina regula su propia liberación a través de la activación de autoreceptores muscarínicos así como por influencia de la adenosina sobre sus receptores (Kase, 2001). Se ha evaluado el efecto de los antagonistas de los receptores A₁ y A_{2A} sobre la liberación de acetilcolina en rebanadas de estriado de rata y se ha demostrado que los antagonistas A₁ no tienen efecto sobre la liberación de acetilcolina, mientras que los antagonistas A_{2A} disminuyen su liberación (Preston et al., 2000). Además, estudios en sinaptosomas estriatales muestran que los agonistas de los receptores A₁ disminuyen la liberación de acetilcolina de terminales colinérgicas, mientras que los agonistas del receptor A_{2A} estimulan la liberación de acetilcolina (Kirkpatrick y Richardson, 1993). Por lo tanto, la identificación y manipulación farmacológica de los receptores de adenosina ofrece un blanco farmacológico atractivo para el tratamiento de la EP (Marston et al., 1998).

La regulación de la liberación de neurotransmisores a través de la adenosina puede explicar los efectos benéficos de la cafeína, como antagonista no selectivo de los receptores de adenosina en los modelos animales de esta enfermedad. Estudios epidemiológicos han establecido que el consumo de cafeína disminuye el riesgo de padecer EP (Ross y Petrovich, 2001; Ascherio y Chen, 2003). Chen y colaboradores (2001) comprobaron el efecto neuroprotector de la cafeína en un modelo murino de la EP, utilizando diferentes esquemas de exposición a la neurotoxina dopaminérgica MPTP (dosis única y múltiple) y en diferentes cepas de ratones (C57B1/6 y 129-Steel). La cafeína (5-30mg/kg), revirtió de manera dosis dependiente la pérdida de dopamina (DA) estriatal, inhibió la pérdida de transportadores de DA, y la pérdida de innervación dopaminérgica ocasionada por el MPTP. La influencia protectora de la cafeína se atribuyó a un efecto neuroprotector que evitó la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Asimismo, estudios preliminares en ratones demuestran que la teofilina y la paraxantina a concentraciones micromolares también atenúan la toxicidad del MPTP (Xu et al., 2002; Fredholm et al., 1999). El efecto

neuroprotector de los antagonistas no específicos de los receptores de adenosina es mimetizado por múltiples antagonistas específicos A_{2A} pero no por antagonistas A_1 (Chen *et al.*, 2001). El hecho de que la toxicidad por MPTP se reduce en ratones knockout del receptor A_{2A} , apoya la idea de que el efecto neuroprotector de las metilxantinas está mediado por el bloqueo de estos receptores (Schwarzschild *et al.*, 2003).

Los efectos antiparkinsonianos tanto de la cafeína como de la teofilina se han demostrado utilizando el modelo de catalepsia inducida con haloperidol. La administración de teofilina (5, 15, ó 30 mg/kg, s.c.) en ratas muestra una inhibición de la catalepsia dependiente de la dosis (Casas *et al.*, 1988, Malec, 1997). Además, las evidencias clínicas indican que la administración oral de cafeína y teofilina a dosis bajas (116 y 76 mg, respectivamente) tienen efectos en el funcionamiento psicomotor en voluntarios de la tercera edad (Bryant *et al.*, 1998), y que 11 de 15 pacientes de EP tratados por 12 semanas con teofilina con una preparación oral de liberación sostenida (150 mg/día), reportaron moderada o marcada mejoría subjetiva en la evaluación de su discapacidad (Mally y Stone, 1994).

Los experimentos en que se combinaron anticolinérgicos y antagonistas adenosinérgicos han aportado resultados alentadores. El trihexifenidilo y la cafeína mostraron un efecto sinérgico en el modelo experimental de acinesia con reserpina (Moo-Puc *et al.*, 2003) y de catalepsia inducida con haloperidol (Moo-Puc *et al.*, 2004). Posteriormente, con el fin de conocer el mecanismo de la interacción, así como los receptores involucrados, se probaron antagonistas selectivos de los receptores A_{2A} (ZM 241385) y A_1 (DPCPX) en combinación con trihexifenidilo, donde se demostró claramente que el antagonista A_{2A} es el que reproduce el efecto anticataléptico observado con la combinación de cafeína y trihexifenidilo en el modelo de catalepsia inducida con haloperidol (Villanueva-Toledo *et al.*, 2003).

Por lo anterior, es clara la evidencia experimental que sustenta a los receptores de adenosina como un blanco potencial para el manejo de la EP, y la participación que

tienen en la liberación de acetilcolina. Actualmente, existen antagonistas específicos de cada uno de los receptores de adenosina, sin embargo estos fármacos se empiezan a utilizar en estudios clínicos y sus efectos en la salud son poco conocidos. Por ello, surge el interés por continuar la evaluación de posibles combinaciones entre antagonistas muscarínicos y antagonistas no selectivos de los receptores de adenosina en modelos experimentales de la EP, lo cual podría fundamentar nuevos tratamientos para la enfermedad. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la benzotropina, la teofilina y la combinación de ambos en el modelo de catalepsia inducida con haloperidol en la rata. Con el fin de conocer si los efectos anticatalépticos se asocian a cambios en la liberación de acetilcolina, proponemos medir las concentraciones extracelulares de acetilcolina por microdiálisis en el estriado de la rata, de manera simultánea a las mediciones de catalepsia.

METODOLOGÍA

Animales

Se emplearon ratas Wistar macho adultos de peso entre 200 y 300 g, criadas en el Bioterio de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, las cuales fueron alojadas en cajas de acrílico transparente con acceso libre a alimentos y agua. Los experimentos se llevaron a cabo durante el periodo de luz, entre las 8 y las 19 horas.

Catalepsia

La catalepsia inducida por neurolépticos, es una prueba conductual ampliamente utilizada para monitorear fármacos con potencial antiparkinsoniano. El haloperidol es un fármaco antagonista de tipo competitivo y no selectivo de los receptores de dopamina, ampliamente distribuidos en el estriado. El bloqueo de los receptores suprime el efecto de dopamina en el estriado, lo cual se traduce en la dificultad de movimiento. La catalepsia inducida con haloperidol (Sigma) se realiza con la aplicación de una dosis de 2 mg/kg y se mide con la prueba de la barra horizontal (diámetro, 0.4 cm; longitud, 10.5 cm) la cual se fija a 9 cm de una superficie sobre la cual se coloca el animal en experimentación. Para medir la catalepsia, se colocan las patas delanteras de la rata sobre la barra. Entonces, se suelta al animal y se inicia el conteo del tiempo con un cronómetro. El tiempo que tarda la rata en bajar las patas delanteras de la barra, es llamado tiempo de descenso y su límite máximo es de 300 s. La latencia de catalepsia es definida como el tiempo que transcurre entre la inyección de haloperidol y el intervalo de la prueba donde el tiempo de descenso es mayor o igual a 150 s. La suma de los valores del tiempo de descenso medidos cada 15 min por 5.5 horas a partir de la administración del haloperidol es definida como el tiempo de descenso acumulado.

Microcirugía

Con el fin de implantar una cánula guía cuya punta quedara situada en la región dorsolateral del estriado, se realizó una microcirugía estereotáxica. Una vez anestesiada la rata se colocó en el aparato estereotáxico, se retiró la piel del cráneo y

se localizaron las coordenadas (AP = +0.7, ML = \pm 2.7, DV = -0.45 con respecto a Bregma) de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2006). La guía se introdujo hasta el estriado dorsal y se fijó al cráneo con dos tornillos de acero inoxidable y acrílico dental; en la luz de la guía se introdujo un estilete para prevenir su oclusión. Al final de la cirugía se les administró Licor de Forge (Lab. Aranda, México) para prevenir infecciones y favorecer la cicatrización. Posteriormente, las ratas se colocaron de manera individual en cajas de acrílico con alimento *ad libitum*, y se les administró paracetamol en el agua de bebida.

Microdiálisis

Cuarenta y ocho horas después de la microcirugía, se realizó la inserción de la sonda de microdiálisis (2 mm de largo x 500 μ m de diámetro) y se perfundió con una solución compuesta de cloruro de sodio 140 mM, cloruro de calcio 1.2 mM y cloruro de potasio 4 mM ajustada a un pH de 7.4, en presencia de 100 nM de neostigmina para inhibir la enzima acetilcolinesterasa, a un flujo constante de 2 μ L/min. Las muestras se recolectaron cada 15 minutos durante 6 horas. El experimento se llevó a cabo en el equipo RRETURN (BAS, Chicago) modificado mediante la adaptación de una barra metálica horizontal (14 cm de largo x 4 mm de ancho, a una altura de 9 cm con respecto al fondo del tazón) para el registro de la catalepsia.

Durante la primera hora de perfusión el dializado se descartó, con el fin de que el líquido de perfusión se equilibrara con el fluido extracelular. Posteriormente, se inició la recolección de 3 muestras, para determinar la concentración extracelular basal de acetilcolina antes de recibir, por vía intraperitoneal, el tratamiento correspondiente. Los tratamientos administrados fueron: vehículo (agua desionizada, 1 ml/kg); teofilina (0.928 y 1.856 mg/kg) + vehículo; benzotropina (0.134 y 0.268 mg/kg) + vehículo; la combinación a dosis baja (teofilina, 0.928 + benzotropina, 0.134 mg/kg); y a dosis alta (teofilina, 1.856 + benzotropina 0.268 mg/kg).

Después de la administración de los tratamientos se inició el registro de la catalepsia cada 15 minutos y se recolectaron tres muestras más. Posteriormente, se administró

una dosis de haloperidol (2 mg/kg, i.p.) y se continuó con la recolección de las fracciones de dializado y los registros de catalepsia durante 4 horas. Al final del experimento se retiró la sonda de microdiálisis y los animales fueron sacrificados por decapitación. Finalmente, se extrajo el cerebro y se verificó la trayectoria de la cánula de microdiálisis.

Determinación de acetilcolina por HPLC

Para la cuantificación de los niveles de acetilcolina se empleó cromatografía de líquidos de alta resolución con detector electroquímico, utilizando un electrodo de platino a un potencial de 500 mV con respecto a un electrodo de referencia de Ag/AgCl. La separación de los compuestos se realizó con una columna Acetylcholine analytical column (BAS, Bioanalytical Systems Inc), acoplada a un reactor enzimático que contiene acetilcolinesterasa y colina oxidasa (Acetylcholine/Choline IMER, Bioanalytical Systems Inc). El fundamento de esta técnica se basa en hacer pasar las muestras por la columna de separación y posteriormente, los compuestos pasan por el reactor enzimático que por acción de las enzimas antes mencionadas son convertidas a betaína y peróxido de hidrógeno. Este último es detectado electroquímicamente. La fase móvil estuvo compuesta de perclorato de sodio (0.05 M), Trizma base (0.05 M) y Reactivo ProClin (0.05%), ajustada a un pH de 8.5, a un flujo de 1.7ml/min, con ayuda de una bomba isocrática PerkinElmer (San José, CA). Las soluciones estándar de acetilcolina se prepararon con una solución de ácido acético (pH de 5.5).

Validación del método cromatográfico

Linealidad y límite de detección. La linealidad se determinó analizando una serie de estándares a concentraciones diferentes, desde 50 hasta 800 nM. Se calculó la pendiente, el coeficiente de correlación y el intercepto por el método de regresión lineal. El límite de detección se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: $LD = b + 3 S_{y/x}$, donde, b es el intercepto y $S_{y/x}$ la desviación estándar de la pendiente.

Precisión. Se evaluó la repetibilidad analizando estándares de acetilcolina 6 veces cada uno a seis diferentes concentraciones desde 200 hasta 800 nM, en un mismo día. Así mismo, se evaluó la precisión intermedia, mediante el análisis de los

estándares de seis diferentes concentraciones en 6 días diferentes. Se calculó la desviación estándar, el coeficiente de variación y la media de cada una de las concentraciones. Según el criterio de Horwitz (1982), es aceptable un coeficiente de variación hasta del 21% para precisión intermedia y de 16% para repetibilidad.

Análisis estadístico

La normalidad de los datos se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene, una vez cumplidos estos criterios se procedió a emplear pruebas paramétricas. Para realizar comparaciones múltiples de los tiempos de descenso acumulados se empleó un ANOVA seguido de una prueba *a posteriori* de Tukey. Como los valores de latencia de catalepsia tuvieron varianzas diferentes, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *a posteriori* de Dunn. El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism versión 4. Fueron consideradas significativas aquellas diferencias asociadas a una $P < 0.05$.

RESULTADOS

Validación del método cromatográfico

La figura 1A muestra un cromatograma obtenido después de inyectar una solución estándar de acetilcolina, su tiempo de retención fue de 2.66 minutos. El límite de detección fue de 86 nM y el de cuantificación 176 nM. La linealidad se determinó analizando una serie de siete estándares cuya concentración se encontraba entre 50 y 800 nM. La pendiente tiene un valor de 179, el intercepto 1609 unidades y el coeficiente de correlación 0.997. Estos datos fueron calculados por el método de regresión lineal. Se evaluó la precisión con base a la repetibilidad y a la precisión intermedia (Tabla 1). Se puede observar que los valores obtenidos se encuentran aceptables según el criterio de Horwitz (1982).

Microdiálisis

Una vez validado el método para determinar acetilcolina en dializados provenientes del estriado de la rata, se procedió a realizar la microcirugía de implantación del catéter para la sonda de microdiálisis. Se realizaron microdiálisis de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología. Posteriormente, las muestras colectadas fueron inyectadas al sistema cromatográfico en donde no fue factible medir las concentraciones de acetilcolina (Fig. 1B). Debido a esto, se realizó un experimento en donde las ratas se estuvieron perfundiendo con soluciones de diferente concentración de cloruro de potasio (4 mM y 60 mM). El protocolo consistió en perfundir 1 hora con la solución 4 mM y 1 hora con solución 60 mM de KCl, con la finalidad de provocar una despolarización de las neuronas y observar la liberación de acetilcolina. En la Fig 1C se puede observar el pico de acetilcolina, sin embargo, el límite de cuantificación del método analítico se encuentra por arriba de las concentraciones de acetilcolina observadas en el estriado. Por tal motivo no fue posible determinar los niveles de acetilcolina y los experimentos se limitaron a la evaluación de los fármacos sobre la catalepsia.

Para evaluar la catalepsia se les administraron a las ratas dos inyecciones subsecuentes por vía subcutánea de alguno de los tratamientos enlistados en la metodología, los cuales fueron asignados de manera aleatoria. Desde ese momento se inició el registro de la catalepsia cada 15 minutos y hasta el término de la sesión de 5.5 horas. El haloperidol fue aplicado en una dosis de 2 mg/kg de manera subcutánea 30 minutos después del tratamiento correspondiente (minuto 0).

Catalepsia

Utilizando dosis de benzotropina y teofilina equimolares a 0.1 mg/kg de trihexifenidilo y 1 mg/kg de cafeína, respectivamente, las cuales no presentan ningún efecto sobre la conducta de la catalepsia inducida con haloperidol, se exploró dicha conducta a intervalos de 15 min durante 5.5 horas posteriores a su administración. En el texto, los valores numéricos se reportan como la media \pm la desviación estándar. La figura 2A muestra el curso temporal de la catalepsia, posterior a la administración de las dosis bajas de los fármacos, administrados de manera individual y en combinación. La administración de 0.134 mg/kg de benzotropina se asoció a una disminución en la latencia de la catalepsia con respecto al grupo control (Figura 2B). La prueba de ANOVA indicó que el tratamiento con las dosis bajas de los fármacos produjo efectos significativos: $F(3,27)= 25.98$, $P<0.0001$. El análisis *a posteriori* señaló que el tratamiento con la dosis baja de benzotropina (0.134 mg/kg, s.c.) produjo un aumento significativo en el tiempo de descenso acumulado (4629 ± 715 s, $n=7$) en comparación con el de los animales tratados únicamente con el vehículo (4152 ± 776 s, $n=10$) ($P < 0.05$, prueba de Tukey). Por el contrario, la administración individual de teofilina (0.928 mg/kg, s.c.) no se asoció con cambios en el tiempo de descenso acumulado (4547 ± 940 s, $n=7$) con respecto al grupo control (Fig 2C). La administración conjunta de los fármacos a las mismas dosis sí produjo una disminución significativa en el tiempo de descenso de la catalepsia (3388 ± 837 s, $n=7$) con respecto al grupo control y a los grupos individuales de benzotropina y teofilina ($P < 0.001$, prueba de Tukey) (Figura 2C).

Utilizando el doble de la dosis inicial de benzotropina y teofilina, se exploró la conducta de catalepsia. La figura 3A muestra el curso temporal observado después de la administración de los fármacos. La prueba de ANOVA señaló que el tratamiento con las dosis altas de los fármacos produjo efectos significativos: $F(3,27)= 46.31$, $P<0.0001$. A diferencia de lo observado con la dosis baja, el análisis *a posteriori* mostró que el tratamiento con la dosis alta de benzotropina (0.268 mg/kg, s.c.) produjo una reducción significativa del tiempo de descenso acumulado (3239 ± 833 s, $n=7$) en comparación con el de los animales tratados únicamente con el vehículo (4152 ± 776 s, $n=10$) ($P < 0.001$, prueba de Tukey). Al igual que lo ocurrido con la dosis baja, la administración individual de la teofilina (1.856 mg/kg) no se asoció con cambios significativos en el tiempo de descenso acumulado (3892 ± 680 s, $n=7$) con respecto al grupo control, sin embargo, fue diferente de los otros tratamientos ($P < 0.01$ comparado con el grupo de benzotropina, Fig 3C). Cuando se administraron en combinación las dosis de teofilina 1.856 mg/kg y benzotropina 0.268 mg/kg, se obtuvo una disminución estadísticamente significativa y más notable en el tiempo de descenso acumulado de la catalepsia (2486 ± 1076 s, $n=7$) con respecto al control y los grupos de administración individual ($P < 0.001$) (Figura 3C). La administración de la combinación señaló un aumento en la latencia de la catalepsia con respecto al grupo control (Figura 3B). Los resultados obtenidos con las dosis bajas y altas muestra que la combinación de fármacos produjo un efecto sinérgico, ya que el promedio de inhibición fue significativamente diferente del grupo que recibió sólo teofilina o sólo benzotropina.

En la figura 4 se muestra un resumen de los resultados obtenidos, en donde se observa el efecto anticataléptico de la benzotropina a la dosis de 0.268 mg/kg (Figura 4A), la carencia de efecto de teofilina (Figura 4B), y el notable efecto anticataléptico producido por la combinación de los fármacos, a ambas dosis estudiadas (Figura 4C).

DISCUSIÓN

Mediante este estudio se demostró el efecto sinérgico de la teofilina y la benzotropina en el modelo de catalepsia inducida con haloperidol en la rata, a dos diferentes dosis. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el bloqueo de los receptores de adenosina contrarresta la estimulación colinérgica excesiva que resulta del bloqueo dopaminérgico. Sin embargo, dado que las limitaciones de la técnica cromatográfica imposibilitaron corroborar una disminución en la concentración extracelular de acetilcolina asociada a la administración de teofilina, queda abierta la posibilidad de que la teofilina haya actuado a otro nivel, por ejemplo en la terminal glutamatérgica cortical, o en la misma neurona gabaérgica estriatal donde actúa el anticolinérgico.

La teofilina (1,3-dimetilxantina) es un broncodilatador que se ha usado por más de 70 años en el tratamiento del asma y la enfermedad pulmonar crónica obstructiva. A pesar de que se emplea en la clínica desde hace muchos años, su mecanismo de acción no es muy claro. Algunos de los mecanismos propuestos son la inhibición no selectiva de las fosfodiesterasas, el bloqueo de los receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y $P2Y_{15}$), incremento en la liberación de IL-10, estimulación de la liberación de adrenalina, inhibición de mediadores inflamatorios (prostaglandinas y $TNF\alpha$), inhibición de la liberación de calcio intracelular e inhibición de NF- κ B, incremento de la apoptosis, e incremento de la actividad desacetilasa de histonas (Barnes, 2005). Muchos de estos mecanismos parecen actuar sólo a concentraciones plasmáticas por arriba de 20 mg/L. Sin embargo, la teofilina es un potente inhibidor de los receptores de adenosina a concentraciones terapéuticas, lo que ocasiona algunos de sus efectos adversos, como cefalea, náusea y vómito, malestar abdominal y cansancio entre otros. También puede incrementar la secreción de ácido, promover el reflujo gastroesofágico e inducir diuresis. A altas concentraciones se asocia a convulsiones y arritmias cardíacas, a través del bloqueo del receptor A_1 (Barnes, 2005). Sin embargo, a las dosis tan pequeñas como las empleadas en el presente trabajo existe poca probabilidad de aparición de estos efectos colaterales.

El motivo para emplear la teofilina en un modelo de la EP, es su antagonismo sobre los receptores de adenosina. En este trabajo, la administración subcutánea de teofilina a dosis de 0.928 y 1.856 mg/kg no produjo ningún efecto sobre la catalepsia debido a que éstas son dosis muy bajas comparadas con las que se han empleado previamente. Existen reportes en donde se observó el efecto anticataléptico de teofilina a dosis entre 5 y 50 mg/kg. En otros modelos experimentales de la EP, la teofilina tiene la capacidad de atenuar la toxicidad producida por MPTP (Schwarzschild et al., 2003). Además, existe un reporte en donde se empleó en el modelo de destrucción de células dopaminérgicas mediante 6-hidroxidopamina (6-OHDA), y la teofilina antagonizó de manera dosis dependiente la disminución en la actividad locomotora y la aparición de la catalepsia (Hayakawa et al., 1999).

Por su parte, la benzotropina mostró una tendencia significativa a favorecer la catalepsia a dosis de 0.134 mg/kg, probablemente a través del bloqueo de receptores presinápticos a bajas dosis, similar al previamente reportado para dosis bajas de trihexifenidilo (Moo-Puc et al., 2003), e inhibirla a la dosis de 0.268 mg/kg, por su efecto preponderantemente postsináptico. Este antagonista muscarínico reconocido para tratar síntomas de la EP no es tan recomendable en personas de la tercera edad debido a sus efectos adversos que incluyen visión borrosa, estreñimiento, sequedad de boca, retención urinaria, pérdida de memoria, confusión, depresión y alucinaciones. Sin embargo, si se disminuye su dosis al administrarlo con otro fármaco como la teofilina, se disminuye el riesgo de que aparezcan los efectos adversos de los dos fármacos.

Conforme a la hipótesis de trabajo y a los estudios previos de interacción entre fármacos similares a los utilizados en el presente estudio, el sinergismo entre la benzotropina y la teofilina puede ser explicada por el bloqueo los receptores muscarínicos postsinápticos que causa la benzotropina y la inhibición de la liberación de acetilcolina asociada al bloqueo de los receptores A_{2A} por la teofilina (Preston et al., 2000). Las referencias citan una hipersensibilidad de los receptores de dopamina tras la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, por lo que la administración de

benzotropina y su efecto inhibidor de la recaptura de dopamina que aumenta su concentración en el espacio extracelular, explicarían parte del efecto terapéutico de este fármaco. Por otra parte, la teofilina se ha empleado en combinación con otros fármacos en diferentes modelos de la EP y bajo diferentes esquemas de dosificación y administración. En ratones reserpinizados, la teofilina (10 y 30 mg/kg, i.p.) induce activación motora, pero cuando se coadministra con NMDA se contrarresta su efecto (Gimenez-Llort et al., 1995). El efecto anticataléptico del CGP37849 y de la dizocilpina, antagonistas competitivo y no competitivo de los receptores NMDA, respectivamente, puede ser potenciado por la coadministración de una dosis umbral de teofilina (2.5 mg/kg, i.p.) en ratas tratadas previamente con haloperidol (0.5 mg/kg, i.p.) (Hauber y Munkle, 1996). Estos hallazgos sugieren que el bloqueo de los receptores de adenosina disminuye la señal glutamatérgica, muy probablemente también a nivel presináptico, como se sugiere para acetilcolina. Las combinaciones de teofilina (2 mg/kg) + levodopa (2 mg/kg) y talipexol (0.005 mg/kg) + teofilina (2 mg/kg) revierten las deficiencias neuroconductuales producidos por 6-OHDA, mientras que si se administran de manera individual no muestran ningún cambio significativo (Hayakawa et al., 1999). De la misma manera, en el presente trabajo al administrar dosis bajas de teofilina no se observó efecto sobre la catalepsia, pero si se combina con otro antiparkinsoniano potencia su efecto anticataléptico, lo cual apoya la hipótesis de que la teofilina ejerce su efecto a nivel presináptico. En estudios clínicos todavía existe controversia al respecto, mientras Kostic y colaboradores (1999) sugieren que la teofilina mejora el tratamiento de los síntomas de la EP e incrementa el tiempo "ON" en pacientes con EP avanzada, Kulisevsky y colaboradores (2002) muestran que la administración conjunta de teofilina con levodopa no es suficientemente clara para potenciar la acción antiparkinsoniana de la levodopa o incrementar el tiempo "ON" en pacientes con EP avanzada.

En conclusión, el sinergismo observado entre la teofilina y la benzotropina puede dar lugar a una nueva combinación de fármacos para el tratamiento de la EP. Sin embargo, es necesario realizar estudios en donde se valoren los efectos adversos que produce la combinación. A diferencia de la cafeína la cual se emplea actualmente

como adyuvante en combinación con otros fármacos como los analgésicos y se conoce su perfil muy sutil de efectos adversos, la teofilina parece no ser tan inofensiva, motivo por el cual se deben corroborar los efectos que ésta produce cuando se administra en combinación con otros antiparkinsonianos. Un efecto recientemente documentado de la teofilina es la inhibición de la desacetilación de histonas a dosis incluso menores a las que produce el bloqueo de receptores de adenosina (Barnes, 2005). Por otro lado, a nivel del sistema nervioso central, se sabe que este tipo de inhibición facilita la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) *in vitro* y la formación de memoria *in vivo* (Levenson, 2004; Miller y Sweatt, 2007), debido a la modificación de la transcripción de genes iniciada por vías activadas a través del receptor NMDA. En este contexto, la teofilina podría tener importantes efectos a nivel de funciones cerebrales superiores, los cuales aún no han sido explorados a profundidad, a excepción de un reporte en ratas, donde se demostró que teofilina atenúa el daño a la memoria causado por exposición a radiación de microondas (Xu *et al.*, 2007).

Agradecimientos

Esta tesis fue financiada con recursos del proyecto SEP-CONACYT 2004 C01-47763 otorgado al Dr. J. L. Góngora Alfaro, C06-FAI-11-10.47 asignado a la Dra. M.E. Jiménez y PIFI 3.1 de la UASLP. La estancia de trabajo de la Dra. M. E. Jiménez fue apoyada por el fondo PIFI-FOMES-CA 2004 de la UADY y la del Dr. J.L. Góngora con el fondo PIFI-FOMES-CA 2006, clave P/CA-60 2006-32-38 otorgado al Cuerpo Académico de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Yucatán.

REFERENCIAS

- Ascherio A, Chen H. Caffeinated clues from epidemiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 61 (Suppl 6), 2003: S51-4.
- Barnes PJ. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons. *Proc Am Thorac Soc*, 2, 2005: 334-9.
- Brocks D. Anticholinergic drugs used in Parkinson's disease: An overlooked class of drugs from a pharmacokinetic perspective. *J Pharm Sci*, 2, 1999: 39-6.
- Bryant CA, Farmer A, Tiplady, Keating J, Sherwood R, Swift CG, Jackson SHD. Psychomotor performance: investigating the dose-response relationship for caffeine and theophylline in elderly volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, 54, 1998: 309-13.
- Casas M, Ferre S, Guix T, Jane F. Theophylline reverses haloperidol-induced catalepsy in the rat. Possible relevance to the pharmacological treatment of psychosis. *Biol Psychiatry*, 24, 1988: 642-8.
- Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, Sonsalla PK, Castagnoli K, Castagnoli N Jr, Schwarzschild MA. Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 21, 2001: 1-6.
- Deleu D, Northway MG, Hanssens Y. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs Used in the Treatment of Parkinson's Disease. *Clin Pharmacokinet*, 41, 2002: 261-309.
- Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev*, 51, 1999: 83-133.
- Gimenez-Llort L, Martinez E, Ferre S. Dopamine-independent and adenosine-dependent mechanisms involved in the effects of N-methyl-D-aspartate on motor activity in mice. *Eur J Pharmacol*, 275, 1995: 171-7.
- Hauber W, Munkle M. The adenosine receptor antagonist theophylline induces a monoamine-dependent increase of the anticataleptic effects of NMDA

receptor antagonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 354, 1996: 179-86.

- Hayakawa T, Sugimoto Y, Chen Z, Fujii Y, Kamei C. Effects of anti-Parkinsonian drugs on neurobehavioural changes induced by bilateral 6-hydroxydopamine lesions in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26, 1999: 421-5.
- Horwitz W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal Chem*, 54, 1982: 67-72
- Jenner P. A2A antagonists as novel nondopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. *Neurology*, 61(Suppl 6) 2003: S32–S38.
- Kase H. New aspects of physiological and pathophysiological functions of adenosine A2A receptor in basal ganglia. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65, 2001: 1447-57.
- Kirkpatrick KA, Richardson PJ. Adenosine receptor-mediated modulation of acetylcholine release from rat striatal synaptosomes. *Br J Pharmacol*. 110, 1993: 949-54.
- Kostic VS, Svetel M, Sternic N, Dragasevic N, Przedborski S. Theophylline increases "on" time in advanced parkinsonian patients. *Neurology*, 52, 1999: 1916.
- Kulisevsky J, Barbanj M, Gironell A, Antonijoan R, Casas M, Pascual-Sedano B. A double-blind crossover, placebo-controlled study of the adenosine A2A antagonist theophylline in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*, 25, 2002: 25-31.
- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem*, 279, 2004: 40545–59.
- Malec D. Haloperidol-induced catalepsy is influenced by adenosine receptor antagonists. *Pol J Pharmacol*, 49, 1997: 323-7.
- Mally J, Stone TW. The effect of theophylline on parkinsonian symptoms. *J Pharm Pharmacol*, 46, 1994: 515-7.

- Marston HM, Finlayson K, Maemoto T, Olverman HJ, Akahane A, Sharkey J, Butcher SP. Pharmacological characterization of a simple behavioral response mediated selectively by central adenosine A1 receptors, using In vivo and In vitro techniques. *JPET* 285, 1998: 1023–1030.
- Miller JN, Miller JC. Estadística y quimiometría para química analítica. Prentice Hall. 4ta edición. Madrid. 2002.
- Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53, 2007: 857-869.
- Moo-Puc RE, Góngora-Alfaro JL, Alvarez-Cervera FJ, Pineda JC, Arankowski-Sandoval G, Heredia-López FJ. Caffeine and muscarinic antagonists act in synergy to inhibit haloperidol-induced catalepsy. *Neuropharmacology*, 45, 2003: 493-503.
- Moo-Puc RE, Villanueva-Toledo J, Arankowski-Sandoval G, Alvarez-Cervera FJ, Góngora-Alfaro JL. Treatment with subthreshold doses of caffeine plus trihexyphenidyl fully restores locomotion and exploratory activity in reserpinized rats. *Neurosci Lett*, 367, 2004: 327-31.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press Inc. San Diego. 2004.
- Preston Z, Lee K, Widdowson L, Freeman TC, Dixon AK, Richardson P. Adenosine receptor expression and function in rat striatal cholinergic neurons. *Br J Pharmacol*, 103, 2000: 886-90.
- Ross GW, Petrovitch H. Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. *Drugs Aging*, 18, 2001: 797-806.
- Schwarzschild MA, Xu K, Oztas E, Petzer JP, Castagnoli K, Castagnoli N, Chen JF. Neuroprotection by caffeine and more specific A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *Neurology*, 61 (Suppl6), 2003: S55–S61.
- Villanueva-Toledo J, Moo-Puc RE, Góngora-Alfaro JL. Selective A2a, but not A1 adenosine antagonists enhance the cataleptic action of trihexyphenidyl in rats. *Neurosci Lett*, 346, 2003: 1-4.

- Wu SS, Frucht SJ. Treatment of Parkinson's disease: what's on the horizon? *CNS Drugs*, 19, 2005: 723-43.
- Xu K, Xu YH, Chen JF, Schwarzschild MA. Neuroprotection by metabolites of caffeine may prolong its neuroprotective effect in the MPTP model of PD. *Soc Neurosci Abstracts*. 2002: A487.5.
- Xu ZW, Hou B, Li YF, Gao Y, Su ZT, Yang GS, Zhao SF, He FC, Zhang CG. Theophylline attenuates microwave-induced impairment of memory acquisition. *Neurosci Lett*, 412, 2007: 129-33.

PIES DE FIGURA

Figura 1. A) Cromatograma obtenido posterior a la inyección de un estándar de acetilcolina (1000 nM) al sistema cromatográfico. B) Cromatograma obtenido de un dializado proveniente del estriado de la rata con una solución de perfusión con 4 mM de cloruro de potasio, en donde no es posible observar el pico de acetilcolina (TR= 2.66 min), el pico con tiempo de retención de 3.66 minutos corresponde a colina. C) Cromatograma de un dializado proveniente del estriado de la rata obtenido con una solución de perfusión con 60 mM de cloruro de potasio. Se observa el aumento en la liberación de acetilcolina tras haber provocado la despolarización de las neuronas. Nótese que la escala (en mV) de la figura 1A es diferente de las otras figuras, motivo por el cual el pico de acetilcolina se observa de gran tamaño.

Figura 2. A) Curso temporal de la catalepsia en la prueba de la barra. La administración del vehículo, la benzotropina (0.134 mg/kg), la teofilina (0.928 mg/kg), o la combinación de fármacos se realizó 30 min antes del haloperidol. Los símbolos representan la media de cada grupo \pm error estándar. B) Latencia de la catalepsia, las líneas horizontales señalan la mediana de los valores de latencia. Kruskal-Wallis $H_4 = 10.61$, $P = 0.014$; prueba *a posteriori* de Dunn: * $P < 0.05$ vs. vehículo;. C) Tiempo de descenso acumulado \pm error estándar medidos durante 5 horas después de administrar el haloperidol. ANOVA de una vía: $F(3,27) = 25.98$, $P < 0.0001$; prueba *a posteriori* de Tukey: * $P < 0.05$ vs. vehículo, *** $P < 0.001$ vs. grupos tratados con vehículo, benzotropina o teofilina.

Figura 3. A) Curso temporal de la catalepsia en la prueba de la barra. La administración del vehículo, la benzotropina (0.268 mg/kg), la teofilina (1.856 mg/kg), o la combinación de fármacos se realizó 30 min antes del haloperidol. Los símbolos representan la media de cada grupo \pm error estándar. B) Latencia de la catalepsia, las líneas horizontales señalan la mediana de los valores de latencia. Kruskal-Wallis: $H_4 = 11.0$, $P = 0.012$; prueba *a posteriori* de Dunn: * $P < 0.05$ vs. vehículo y el grupo de teofilina sola. C) Tiempo de descenso acumulado \pm error

estándar medidos durante 5 horas después de administrar el haloperidol. El antagonista muscarínico benzotropina presenta un sinergismo con la teofilina. ANOVA de una vía: $F(3,27) = 46.31$, $P < 0.0001$; Prueba *a posteriori* de Tukey: * $P < 0.001$ vs. benzotropina, ** $P < 0.001$ vs. vehículo, *** $P < 0.001$ vs. grupos tratados con vehículo, benzotropina o teofilina.

Figura 4. Gráficas que muestran de manera comparativa el curso temporal de los fármacos, agrupados por tipo de tratamiento: solo benzotropina (A), solo teofilina (B) y la combinación (C). La porción sombreada muestra las diferencias entre las dos dosis evaluadas de los fármacos.

CONCENTRACION ACETILCOLINA (nM)	REPETIBILIDAD		PRECISIÓN INTERMEDIA	
	PROMEDIO (mV)	%CV	PROMEDIO (mV)	%CV
200	38444.9	11.5	35628.2	11.4
300	57267.9	15.4	49103.5	14.3
400	72651.0	11.0	63294.4	11.0
500	87442.5	13.0	75984.8	9.4
600	108101.0	11.2	93164.3	16.8
800	147332.6	9.0	124114.8	15.8

Tabla 1. Parámetros evaluados en la validación del método analítico para la cuantificación de acetilcolina. La precisión del método se evaluó como repetibilidad calculando el porcentaje de coeficiente de variación de seis curvas de calibración realizadas el mismo día. La precisión intermedia es el resultado de las curvas de calibración realizadas en seis días.

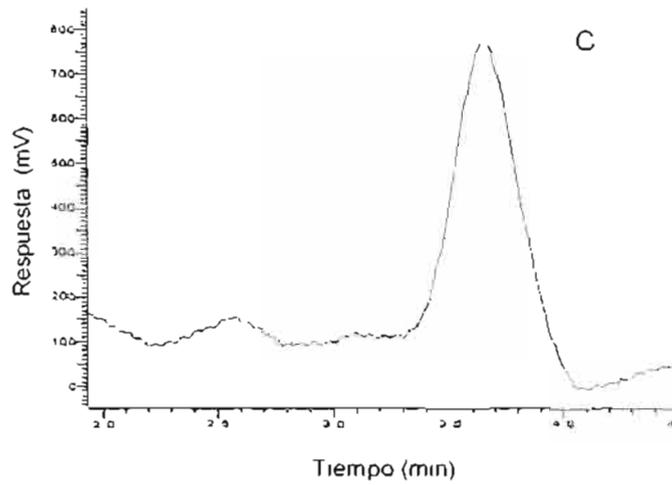
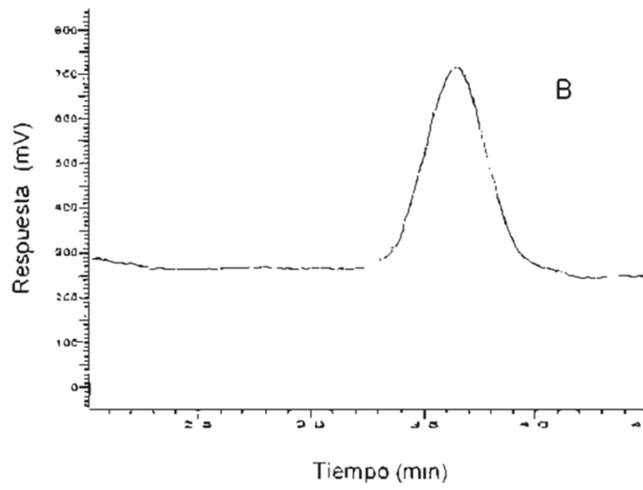
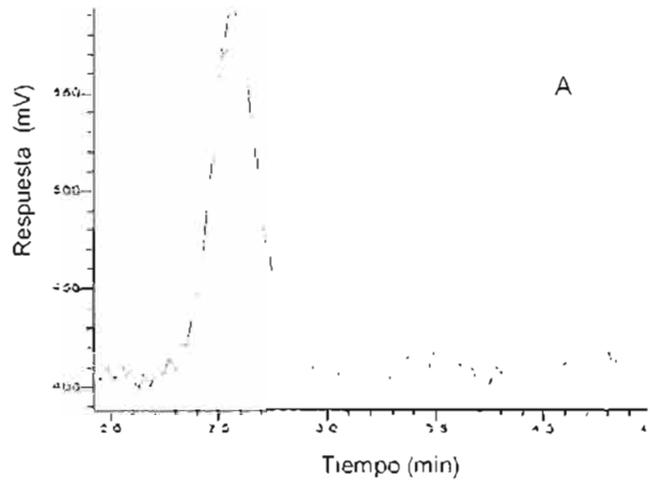


Figura 1

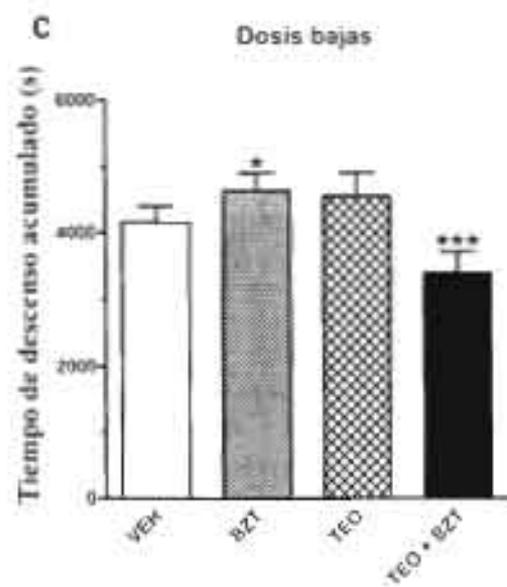
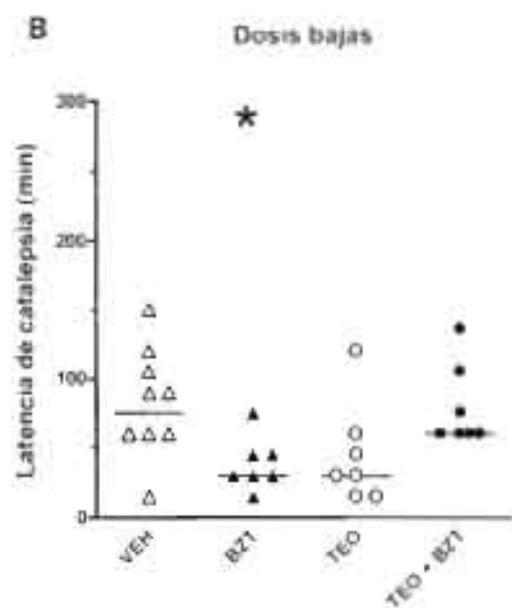
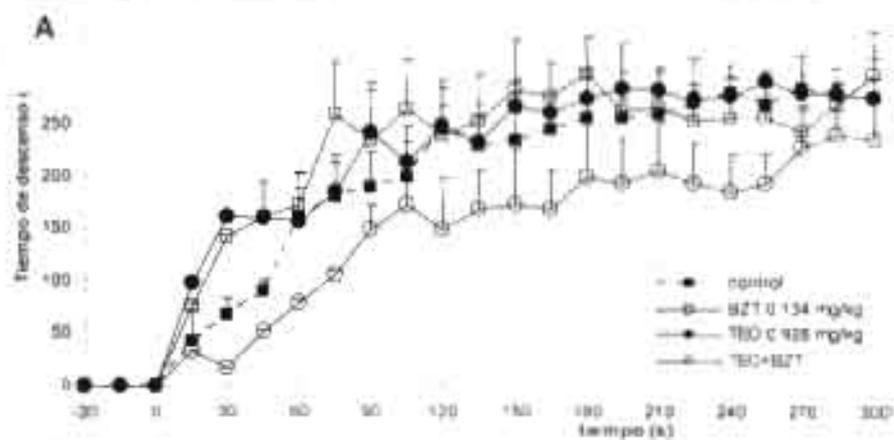


Figura 2

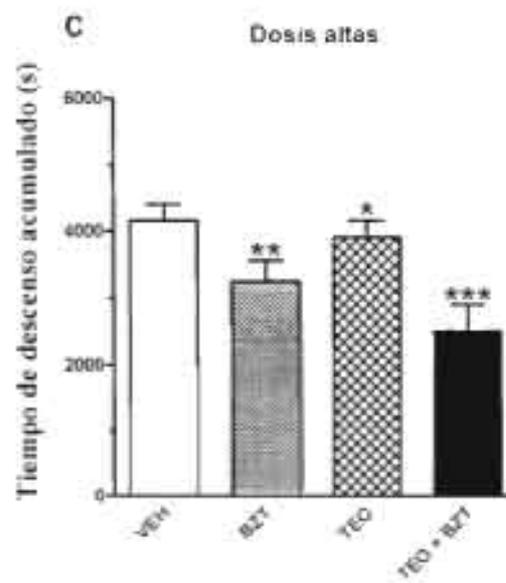
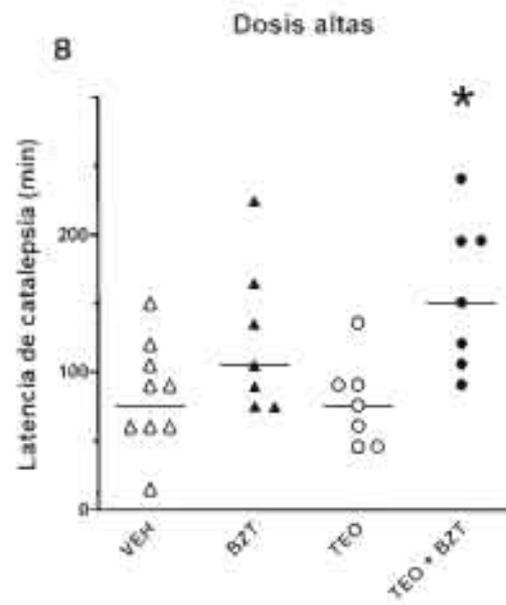
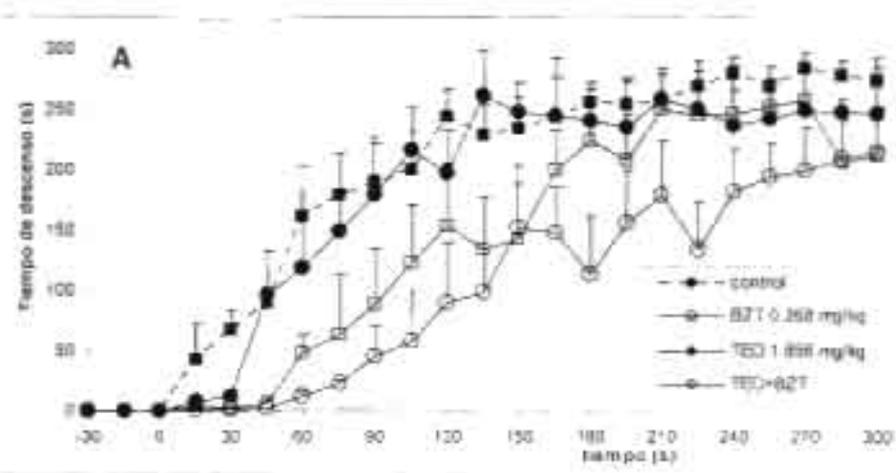


Figura 3

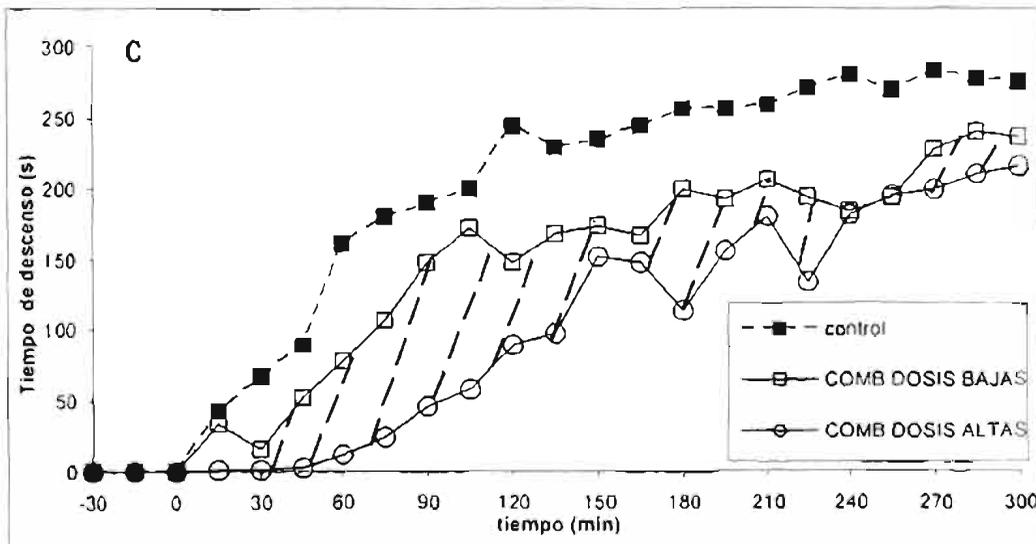
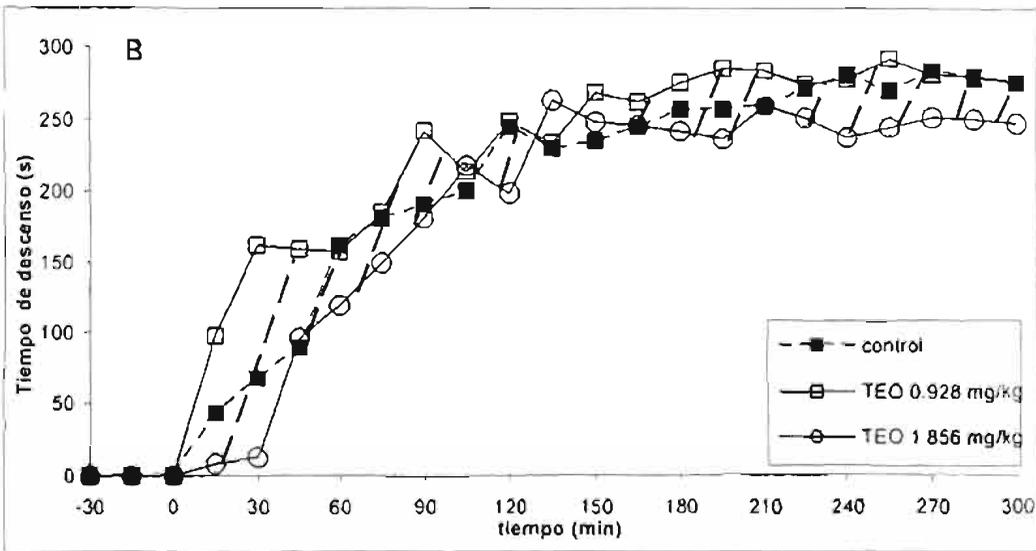
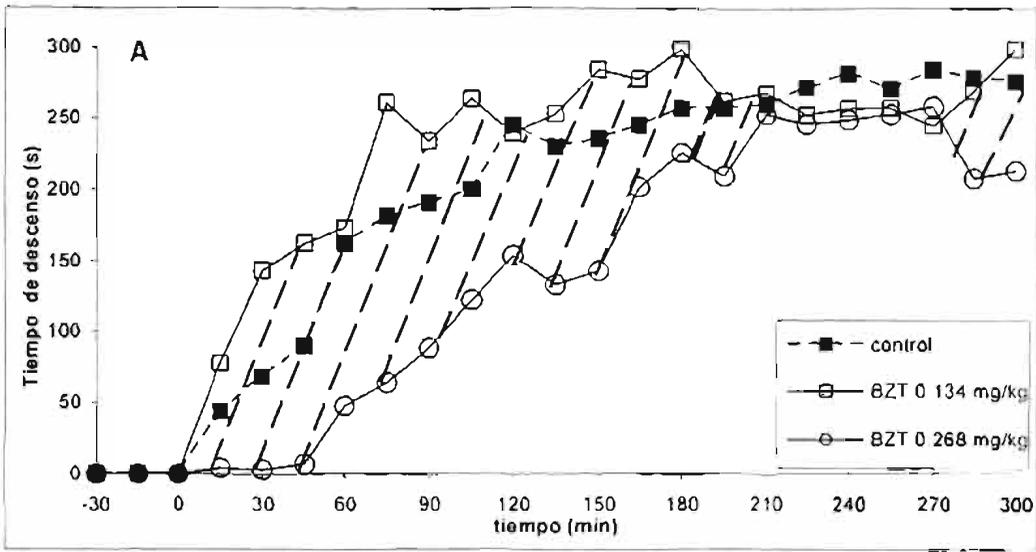


Figura 4

