



FUNDACIÓN H. A.
BARCELÓ
FACULTAD DE MEDICINA



TÍTULO: EFECTO NEUROPROTECTOR DE LOS BLOQUEANTES DEL RECEPTOR TIPO 1 DE ANGIOTENSINA II (AT1) Y DE LOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA II.

DIRECTOR: Dr. Capani, Francisco

INVESTIGADORES COLABORADORES: Dr. Perez Lloret, Santiago y Dr. Udovin, Lucas Daniel.

SEDE-LUGAR: Instituto de Investigaciones cardiológicas (ININCA-UBA-CONICET)

PERIODO: 05/2017 a 05/2020

CONTACTO DEL AUTOR: lucas2304@hotmail.com, splloret@gmail.com, franciscocapani@hotmail.com

Índice

I.	Resumen.....	4
II.	Introducción:	
	a. Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización	5
	b. Justificación y Relevancia	7
	c. Objetivos: General y Especifico.....	7
	d. Marco conceptual	8
III.	Metodología	
	Estudios en líneas celulares	
	a. Tipo de estudio	10
	b. Muestra	10
	c. Ámbito de estudio.....	10
	d. Fuentes e instrumento de recolección de datos	10
	e. Procesamiento y Análisis de la información	11
	Estudios en seres humanos	
	a. Tipo de estudio	11
	b. Muestra	12
	c. Ámbito de estudio.....	12
	d. Fuentes e instrumento de recolección de datos	12
	e. Procesamiento y Análisis de la información	13
IV.	Resultados	
	a. Estudios en líneas celulares	14
	b. Estudios en seres humanos	15
V.	Discusión y Conclusión	17
VI.	Bibliografía.....	19

I. Resumen

Diversos estudios en modelos experimentales de Enfermedad de Parkinson (EP) han mostrado que algunos bloqueantes de los receptores AT1 de Angiotensina II y los inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA) pudieron prevenir el daño neuronal causado por neurotoxinas dopaminérgicas. El objetivo general de este proyecto de medicina traslacional fue estudiar el potencial efecto neuroprotector de los bloqueantes AT1 y de los IECA. Los objetivos específicos fueron: 1) Investigar el efecto de los bloqueantes AT1 sobre la funcionalidad y supervivencia de células dopaminérgicas en cultivo luego de la aplicación de una neurotoxina y 2) Estudiar las diferencias en la progresión clínica de la EP en una base de datos de pacientes parkinsonianos que recibían o antagonistas AT1 o IECA. Para el primer objetivo se trabajó con una línea celular de neuroblastoma humano con perfil dopaminérgico (SH-SY5Y) que se sometieron a daño con la neurotoxina dopaminérgica 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a fin de obtener un fenotipo parkinsoniano. Se cultivaron en placas multiwell de 96 celdas células SHSY5Y obtenidas del biobanco del Instituto ININCA-UBA-CONICET. Los cultivos se incubaron en una primera instancia con control o dosis crecientes de 6OHDA. Al cabo de 24 hs se evaluó la viabilidad celular mediante la prueba del MTT. En una segunda instancia los cultivos tratados con 6OHDA o solución salina fueron preincubados con solución salina o dosis crecientes de Ang II y se determinó la viabilidad celular por el mismo método. Finalmente, en cultivos tratados con 6OHDA y ang II, se pre-administró Losartán en dosis crecientes. Para el estudio clínico se tomaron 423 pacientes con Parkinson de reciente comienzo y sin tratamiento antiparkinsoniano de la base de datos del estudio *Parkinson's Progress Marker Initiative* (PPMI). Se investigó, en primer lugar, por medio de un estudio de casos y controles, la proporción de pacientes expuestos a IECA hidrofílicos o lipofílicos, o antagonistas del AT1, entre aquellos que habían recibido L-DOPA para el parkinson durante el primero año de seguimiento (casos) o no lo había recibido (controles). El requerimiento de L-DOPA durante el primer año de seguimiento es un marcador de progresión de la enfermedad. La progresión de la enfermedad, esta vez evaluada mediante el puntaje MDS-UPDRS II+III registrado durante los primeros 4 años del seguimiento, se comparó en pacientes que recibían o no los medicamentos antes citados. En los estudios en cultivos celulares se estableció que la dosis letal (DL50) de la 6OHDA, es decir aquella que reducía la viabilidad de los cultivos en un 50%, era de 150 microM. Además se observó que la Ang II reducía la viabilidad celular en los cultivos tratados con 6OHDA o no. La dosis de Ang II que redujo a un 50% la viabilidad de los cultivos pre-tratados con 6-OHDA fue de entre 25 y 100 nanoM, estableciéndose la DL50 en 50 nanoM. Finalmente, el pretratamiento con Losartan en dosis de 1, 2, 5 y 10 microM incrementó significativamente la viabilidad celular luego del tratamiento con 6OHDA + Ang II. En el estudio clínico no se observaron asociaciones significativas entre la exposición a los I-ECA o bloqueantes AT1 y la necesidad recibir tratamiento con L-DOPA durante el primer año de seguimiento. Sin embargo, se observó una asociación significativa entre la puntuación MDS-UPDRS II + III y la exposición a los antagonistas AT1 (OR ajustado: 0,88; intervalo de confianza del 95% IC: 0,79-0,98; $p = 0,03$). Tomados en su conjunto los resultados de estos estudios en cultivos celulares y en pacientes con Parkinson sugieren que los bloqueantes AT1 podrían ser efectivos para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson.

II. Introducción:

a. Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer [1]. Se estima que afecta entre 2-10 cada 100.000 personas de todas las edades, llegando hasta el 1-2% en mayores de 65 años [2-4]. Según datos del INDEC esto representa entre 40 y 80 mil personas. Se estima que este valor se duplicará para el 2050. Desde su descripción en 1817 mucho se ha avanzado en conocimiento de su epidemiología. La EP se caracteriza por presentar síntomas motores y no motores [5]. Entre los primeros destacan la rigidez, bradicinesia y temblor de reposo. También se observa hiposmia, trastornos cognitivos, síntomas psiquiátricos, trastornos del sueño, constipación, disfunción autonómica, dolor y fatiga, entre otros síntomas no motores. Todos estos síntomas tienen su origen principal en la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas en la Substancia Nigra y de otros grupos neuronales centrales o periféricos. El evento fisiopatológico más relevante en la enfermedad es la muerte neuronal que afecta a estructuras cerebrales particulares [6]. Se ha postulado que el proceso neurodegenerativo comienza en el tronco encefálico para luego propagarse en sentido ascendente hasta alcanzar los ganglios de la base y, finalmente, las cortezas cerebrales motoras, sensoriales y asociativas [7]. Cuando la depleción de las células dopaminérgicas de la Substancia Nigra pars compacta (SNpc) alcanza el 80%, se producen los síntomas motores anteriormente comentados [5]. Si bien se postulan varias hipótesis en relación a su patogenia inicial y posterior progresión no se han podido traducir en un tratamiento modificador del curso evolutivo de la enfermedad.

Desde la descripción de la enfermedad de Parkinson (EP) en 1817 [8], se han producido numerosos avances con relación a la fisiopatogenia, descripción de subtipos clínicos, presencia de síntomas no motores, métodos diagnósticos, tratamiento de su morbilidad asociada, tratamiento no farmacológico y pronóstico de la enfermedad [5]. Sin embargo, no se cuenta con un tratamiento que impida o enlentezca su avance [9]. Esto se debe principalmente a que si bien se han descrito diversos mecanismos patogénicos involucrados (inflamación, disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo [5, 7, 10] no se conoce fehacientemente el mecanismo que desencadena o perpetúa la inexorable muerte de las neuronas dopaminérgicas. Considerando que la EP es la segunda enfermedad neurológica en frecuencia en pacientes gerontológicos, que su prevalencia aumenta con la edad [11] y el envejecimiento poblacional que se está produciendo y proyectando a nivel mundial [12-14] el desarrollo de un adecuado tratamiento de la EP resulta de máxima importancia. Como se ha mencionado, los inhibidores de la ECA (I-ECA) y los bloqueantes del receptor AT1 han mostrado efectos neuroprotectores en modelos animales de EP, no habiendo evidencia en el ser humano.

Diversos estudios sugieren un rol fundamental del Sistema Renina Angiotensina (SRA) local en el funcionamiento y supervivencia de las células dopaminérgicas de la SNpc [15]. A nivel funcional, se ha establecido la presencia de un ciclo de retroalimentación entre la Angiotensina II (AngII) y la dopamina [16-21]. Por un lado, la AngII estimula el tono dopaminérgico mediante los receptores de Ang II tipo 1 (AT1) y lo inhibe mediante los AT2. A su vez, la dopamina estimula la producción de AngII mediante receptores D1 y la inhibe mediante los D2. Se ha demostrado además que los pacientes con EP presentan una traslocación de los receptores de AngII hacia la membrana nuclear, donde interactúan con enzimas productores de radicales libres [21, 22]. Diversos estudios en modelos animales de EP han sugerido que el bloqueo de los receptores AT1 y la inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), podrían tener propiedades neuroprotectoras ya que fueron asociados con menor estrés oxidativo y mayor supervivencia de las neuronas dopaminérgicas [15, 21]. En estos estudios, fármacos con efecto inhibitorio de la ECA como el captopril y perindopril y antagonistas del receptor AT1 como el losartan, candesartan y telmisartan, pudieron prevenir el daño neuronal causado por neurotoxinas dopaminérgicas como el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) o la rotenona en ratones, ratas o cultivos de células dopaminérgicas murinas [15, 21].

En relación a su potencial utilidad clínica en humanos, los escasos trabajos reportados que han abordado este interrogante arrojaron resultados contradictorios [21]. En una prueba de concepto realizada en 6 pacientes con EP moderada/severa, el uso de perindopril (I-ECA) se asoció a una mejoría terapéutica al ya instalado tratamiento con Levodopa [23]. En un estudio de cohorte realizado en Taiwan, se objetivó un efecto neuroprotector para el desarrollo de EP a largo plazo para aquellos pacientes tratados en forma sostenida con dosis altas de I-ECA o bloqueantes del receptor AT1 [24]. En cambio, el subanálisis de un estudio dinamarqués con muestreo aleatorio (diseñado con el objeto de estudiar el rol de los bloqueantes cálcicos en la EP) no evidenció una asociación en los pacientes tratados con I-ECA o bloqueantes del receptor AT1 y el riesgo de desarrollar EP [25]. Hallazgos similares fueron reportados recientemente en Alemania en el estudio de asociación entre el uso de antihipertensivos (incluyendo I-ECA e inhibidores de AT1) y la incidencia de EP [26]. Es por ello que resulta de fundamental importancia que antes de comenzar con estudios clínicos en seres humanos tener datos preliminares más sólidos sobre la potencial eficacia de los bloqueantes del receptor AT1 e inhibidores de la ECA sobre la progresión clínica de la EP y sobre su posible mecanismo neuroprotector. Al mismo tiempo, los mecanismos intracelulares neuronales desencadenados por la activación del AT1 son mayoritariamente desconocidos en células de origen humano, ya que los estudios en cultivos neuronales corresponden a cultivos celulares de origen murino no humano.

b. Justificación y Relevancia

Como se mencionó la EP afecta al 2% de los adultos mayores. Considerando el envejecimiento de la población, muchos expertos alertan sobre la posibilidad de que esta enfermedad se vuelva un problema de salud pública hacia el 2050.

El tratamiento de la EP es en la actualidad puramente sintomático [27]. El mismo consiste en la estimulación del tono dopaminérgico mediante la administración de levodopa, que es el precursor de la dopamina, de agonistas dopaminérgicos, que estimulan los receptores pre y post-sinápticos, o de fármacos bloqueantes de las enzimas MAO-b y COMT, que degradan la dopamina. En casos avanzados se pueden utilizar técnicas neuroquirúrgicas consistentes en la lesión o estimulación eléctrica continua del núcleo subtalámico o del Globo Pálido [27]. Sin embargo, todos estos fármacos presenten efectos adversos, y tiene poca o ninguna eficacia para muchos de los síntomas no motores. Por otro lado, los costos directos e indirectos de la EP podrían ascender en nuestro país a más de 500 millones de dólares [28]. Todo esto podría ser evitado si se contara con la posibilidad de prevenir la muerte neuronal o, cuando menos, ralentizar el proceso neurodegenerativo.

La identificación de agentes “neuroprotectores” es, por tanto, la asignatura pendiente de mayor importancia en el tratamiento de la EP. La búsqueda de dichos agentes llevada a cabo durante los últimos 10 años ha resultado infructuosa. Es por eso que se requiere más investigación básica para caracterizar agentes neuroprotectores que puedan demostrar ser eficaces y seguros para su administración en pacientes. El SRA participa en la regulación de la actividad y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. Por ello, los agentes moduladores del SRA podrían ser utilizados como fármacos neuroprotectores en la EP. Para ello se realizarán estudios en cultivos de neuronas con perfil dopaminérgico de estirpe humano y en pacientes. Los resultados de estos estudios serán complementarios y son indispensables para la planificación de ulteriores estudios clínicos para demostrar su efecto neuroprotector.

c. Objetivos: General y Especifico

Objetivo General

El objetivo general de este proyecto es explorar los potenciales mecanismos intracelulares neuroprotectivos de los bloqueantes AT1 en una línea celular de neuronas con perfil dopaminérgico de estirpe humano y explorar los potenciales correlatos clínicos de dicho efecto utilizando la base de datos del estudio de seguimiento longitudinal Parkinson's Progress Marker Initiative (PPMI) de pacientes con EP de reciente diagnóstico.

Objetivos específicos

- Investigar el efecto de los bloqueantes del receptor tipo 1 de Angiotensina II (AT1) sobre la funcionalidad y supervivencia de células dopaminérgicas en cultivo luego de la aplicación de una neurotoxina.
- Estudiar las diferencias en la progresión clínica de la EP en una base de datos de pacientes parkinsonianos que recibían o antagonistas AT1 o bloqueantes ECA.

d. Marco conceptual

Se ha observado un grado significativo de interacción entre la dopamina y la AngII en los ganglios de la base. Por ejemplo, la infusión de AngII en preparados in vitro de cortes del núcleo estriado provocó un incremento en la exocitosis de dopamina [16], efecto que pudo ser bloqueado por losartan, un antagonista AT1 [29]. Por otro lado, resultados recientes sugieren que la aplicación de un agonista selectivo del receptor AT2 tiene efectos contrarios [30]. Finalmente, la inhibición de la ECA produce un incremento de la síntesis y liberación de dopamina en ratas [20].

Por su parte, la dopamina también modula la síntesis y liberación de AngII. Por ejemplo, la depleción de dopamina produjo up-regulation de los receptores AT1 y AT2, que cedió luego de normalizar el tono dopaminérgico [31]. Más aún, ratones knock-out de receptores D1 mostraron un incremento de AT1, mientras que los KO de receptores D2 mostraron una reducción en el nivel de AT2 [32].

Por otro lado, los estudios en líneas celulares y en modelos animales de EP sugieren un efecto neuroprotector de los bloqueantes de la ECA y de los bloqueantes de los receptores AT1. Por ejemplo, los efectos del losartan fueron estudiados en el modelo de cultivo celular de neuronas dopaminérgicas mesenquimales, obtenidos de embriones de rata Sprague-Dawley [33]. Una vez adquirido el fenotipo dopaminérgico, las células del cultivo fueron tratadas con 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), que es el metabolito activo de la neurotoxina MPTP, que afecta selectivamente a las neuronas dopaminérgicas. El tratamiento resultó en la muerte de entre el 95-98% de las neuronas del cultivo. La administración de AngII previa al MPP+ redujo la muerte neuronal. Más aún, la administración del bloqueante AT1 losartan magnificó el efecto de la AngII, mientras que el PD123319, un antagonista AT2, bloqueó el efecto de esta sustancia. Esto sugiere que los efectos neuroprotectores de la AngII son mediados por el receptor AT2, al menos parcialmente. En una línea celular murina (CATH.a) se observó que la administración de CGP42112 (agonista de AT2) atenúa el estrés oxidativo inducido por la rotenona a través de la activación de AT2 y la supresión de la expresión de la NADPH oxidasa [10]. Otros estudios

en cultivos celulares similares han mostrado que la muerte celular es acompañada por una activación de la microglía y por la producción de radicales libres por la enzima NADPH-oxidasa [34]. El receptor AT1 produciría la activación de esta enzima, a través de la estimulación de la enzima PKC.

La evidencia clínica sobre la utilidad de los fármacos moduladores del SRA para el tratamiento de la EP es escasa, contrastando con la abundante bibliografía en modelos animales y cultivos celulares animales. Sin embargo, algunos estudios sugieren que las alteraciones del SRA son claves para el desarrollo de la EP. Por ejemplo, estudios de radiomarcación post-mortem en cerebros de pacientes EP y controles han mostrado una reducción de entre el 60 y 90% de la cantidad de receptores de membrana AT1 y AT2 en los ganglios de la base de los pacientes con EP [35]. Sin embargo, estudios posteriores utilizando métodos similares precisaron que esto se acompaña de un incremento del receptor AT1 nuclear, el cual parecería relacionarse con la NAPDH-oxidasa [22].

El efecto clínico del perindopril, un bloqueante ECA, fue estudiado en un estudio piloto, doble ciego, cruzado en 7 pacientes con EP [23]. Los pacientes padecían una enfermedad de severidad leve a moderada y todos estaban medicados con levodopa y otros antiparkinsonianos. Los pacientes recibieron 2 mg diarios de perindopril por 1 semana o placebo, siendo la secuencia aleatoria. Al principio y al final de cada período se realizó una prueba aguda de levodopa. La misma consiste en registrar el efecto clínico tras la administración de levodopa/carbidopa 200mg/50mg. En el periodo en que los pacientes recibieron perindopril, el efecto antiparkinsoniano de la levodopa fue mayor y la latencia hasta la aparición de los primeros fue menor. Un paciente se vio obligado a discontinuar el estudio porque experimentó náusea y malestar con perindopril. Estos resultados son compatibles con los resultados en animales y cultivos celulares que muestran un incremento del tono dopaminérgico con inhibidores de la ECA, no relacionado con la neuroprotección.

Por el contrario, como ya hemos mencionada anteriormente no hay hasta el momento estudios clínicos sobre el potencial efecto neuroprotector de los fármacos modulares del SRA. Sin embargo, un estudio de cohorte reciente mostró que los pacientes hipertensos tratados con altas dosis de inhibidores de la ECA o bloqueantes del AT1, presentaban menor riesgo de desarrollar EP durante su vida [24]. En este estudio se analizaron datos de 65 mil pacientes hipertensos libres de enfermedades neurológicas al inicio del seguimiento, identificados mediante la base de datos del sistema médico nacional de Taiwan. Los pacientes fueron seguidos por una media de 4,6 años. Los resultados mostraron que aquellos pacientes que recibían dosis elevadas de estos fármacos (en el quintil más elevado) presentan una reducción significativa del riesgo de EP del 48%. Estos resultados son

promisarios, pero no han sido replicados. En particular, no se sabe si la administración de estos medicamentos podría reducir la velocidad de progresión de la EP.

III. Metodología

Estudios en líneas celulares

a. Tipo de estudio (primer estudio)

Estudio de investigación básica

b. Muestra

Se trabajará con una línea celular de neuroblastoma humano con perfil dopaminérgico (SH-SY5Y) que se someterán a daño con una neurotoxina llamada 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a fin de obtener un fenotipo parkinsoniano [36, 37]. Estas células se utilizan habitualmente para estudiar los mecanismos de la neurodegeneración en Parkinson y los efectos de drogas con potencial efecto neuroprotector, ya que manifiestan un perfil dopaminérgico en circunstancias experimentales.

c. Ámbito de estudio

Laboratorios del ININCA

d. Fuentes e instrumento de recolección de datos

Se resumen a continuación los procedimientos experimentales.

- Determinación de la dosis letal 50 (DL50) de 6OHDA: Se cultivaron en placas multiwell de 96 celdas células SHSY5Y obtenidas del biobanco del Instituto ININCA-UBA-CONICET. Los cultivos fueron mantenidos en medio Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) and Ham's F-12 (DMEM-F12) con suero fetal bovino al 10% y 100 U/mL de penicilina y 100 µgrs/mL de streptomina, en un ambiente a 37º con 5% de CO2 durante 24 hs para permitir su adherencia. Los cultivos se incubarán con (1) vehículo (control) siendo el mismo PBS o dosis crecientes de (2) 6OHDA (Sigma) 25, 50, 100, 150, 200 y 300 uM por espacio de 24 horas. Se utilizaron 3 celdas por cada dosis ensayada y los experimentos se realizaron por triplicado. Al cabo de ese tiempo, se evaluó la viabilidad celular mediante la prueba del MTT. Para ello se adicionó al medio de cultivo de cada celda 10 microlitros de MTT (solución de 5 mg/mL) en un volumen final de 100 microlitros, y se dejó actuar por espacio de

4 horas. Pasado ese tiempo, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200 microlitros de dimetilsulfóxido (DMSO). Se utilizó un espectrofotómetro para cuantificar los resultados, que es una medida indirecta de la masa celular viable.

- Determinación de dosis letal 50 (DL50) de Ang II: los cultivos serán incubados con (1) vehículo o dosis crecientes de (2) AngII (1, 5, 10, 25, 50, 100 nM) [38] las cuales serán administradas 30 minutos antes de la neurotoxina o su vehículo. Luego de 24 horas de administrada la toxina o el vehículo, se determinó la viabilidad celular por MTT.
- Efecto del losartan (antagonista AT1) con determinación de dosis de máximo efecto: los cultivos recibirán por un lado DL50 Ang II, por el otro DL50 de 6OHDA o (1) vehículo sin el agregado y con el agregado de dosis crecientes de (2) losartán (un antagonista AT1) (1, 2, 5, 10 uM) [38] 30 minutos antes de la neurotoxina . Luego de 24 horas de administrada la toxina, se determinó la densidad celular por MTT.

En un segundo paso experimental los cultivos fueron incubados con vehículo o Angiotensina II (1, 5, 10, 25, 50, 100 o 300 nM), las que fueron administradas 30 minutos antes de la neurotoxina o su vehículo. Luego de 24 horas de administrada la toxina o el vehículo, se determinó la densidad celular por MTT. Finalmente, los cultivos fueron expuestos al losartán (un antagonista AT1) 1, 2, 5, 10 uM, 30 minutos antes de administrar la neurotoxina.

e. Procesamiento y Análisis de la información

Se calcularon las medias y desvío estándar de los resultados de las determinaciones de la densidad celular por MTT. Los mismos se graficaron en función de las intervenciones. Se calcularon las dosis letales 50 o dosis efectivas 50, como las dosis de las diferentes sustancias investigadas que incrementaban o reducían la densidad celular en un 50% de lo observado en el grupo control.

Estudios en seres humanos

a. Tipo de estudio

Para este estudio se utilizó la base de datos del estudio “Parkinson’s Progress Marker Initiative” (PPMI) [39]. El mismo consiste en un estudio prospectivo en el que se incluyeron

400 pacientes con Parkinson de reciente diagnóstico, que no recibían al momento de la inclusión ningún tratamiento para la enfermedad, y 200 controles sanos pareados por edad y sexo (que no fueron utilizados para nuestros estudios).

El estudio se condujo en 21 centros especializados en la atención de pacientes con Parkinson (16 en los Estados Unidos y 5 en Europa). Cada centro participante obtuvo la aprobación del Comité de Ética de la institución previo al inicio del protocolo [39]. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado previo a su participación.

Los datos del estudio son distribuidos de manera onerosa a todo aquel investigador que lo desee, previa aprobación del Consejo de Administración del estudio. Los datos se proveen de manera anonimizada.

En esta base de datos condujimos un estudio de casos y controles y uno de cohorte retrospectivo, como se describirá más abajo.

b. Muestra

En nuestro estudio se incluyeron 423 pacientes con EP de reciente diagnóstico, libres de tratamiento antiparkinsoniano al momento de la inclusión, obtenidos de la base de datos PPMI [39]. Los criterios de inclusión fueron: 1) un historial de EP de 2 años, 2) un estadio I o II de Hoehn y Yahr en el momento de la inscripción, y 3) un déficit de la proteína transportadora de dopamina medido por tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

c. Ámbito de estudio

Para este estudio se utilizó la base de datos del estudio “Parkinson’s Progress Marker Initiative” (PPMI) [39].

d. Fuentes e instrumento de recolección de datos

Para el estudio de casos y controles, los casos se definieron como pacientes con EP que requerían L-DOPA dentro del primer año después del diagnóstico, a diferencia de los controles que no lo hicieron. La fecha índice fue la fecha de la primera prescripción de L-DOPA para casos o la visita más cercana en los controles. Se determinó que un paciente estaba expuesto a algún medicamento bloqueante del AT1 (valsartán, telmisartán, losartán, candesartán, irbesartán, olmesartán, eprosartán, azilsartán, filmasartán,

tasosartán) o a un I-ECA (hidrófilo: captopril, enalapril, imidapril, lisinopril, lipoprilpril, fosilapril, lipoprilpril, fosilapril, lipoprilprilino, perindopril, quinapril, ramipril, espirapril, temocapril, trandolapril, zofenopril), si el mismo había sido prescrito por al menos 2 años al momento de la inclusión. Se registró la dosis del medicamento recibido, la cual fue convertida a Dosis Diarias Equivalentes (DDE) para facilitar su análisis (OMS). Se utilizaron como variables de interés clínico al puntaje MDS-UPDRS 2+3, que evalúa la severidad clínica de la enfermedad en la condición inactiva prácticamente definida. Se comparó la proporción de casos y controles expuestos a bloqueantes AT1 o I-ECA. Se calcularon los Odds Ratios (OR) sin ajustar y ajustando para la edad y sexo de los sujetos, la severidad de la enfermedad al momento de la inclusión y el puntaje Elixhauser de comorbilidades. Además, se realizaron análisis de sensibilidad por la duración del tratamiento y la dosis.

Para el estudio de cohortes retrospectivo se obtuvo información sobre la evolución clínica de los pacientes con EP durante los primeros cinco años de seguimiento utilizando como variables de interés clínico al puntaje MDS-UPDRS 2+3. Se consideró que un paciente estaba expuesto a bloqueantes AT1 o I-ECA si estaba recibiendo estos medicamentos en una y todas las visitas anteriores y durante dos años antes de la visita inicial. Por ejemplo, la exposición en la visita del primer año significaba que un paciente había estado tomando estos medicamentos durante al menos 2 años al inicio del estudio y durante todo el año a partir de entonces. La exposición en la visita del año 2 significaba que el paciente había estado tomando estos medicamentos durante al menos 2 años al inicio y durante los dos años posteriores, y así sucesivamente para la exposición en los años 3, 4 y 5. Entonces, el estado del paciente podría cambiar de “Expuestos” a “no expuestos” durante el seguimiento, pero no al revés.

e. Procesamiento y Análisis de la información

Para el estudio de casos y controles, se emplearon las pruebas de chi-cuadrado o pruebas t para explorar las diferencias en la exposición al fármaco. Se realizó además un análisis multivariado por regresión logística incluyendo la edad y el sexo, la severidad de la enfermedad en el momento de la inclusión (evaluado por el puntaje MDS-UPDRS II + III) y el puntaje de comorbilidad de Elixhauser, que refleja el estado de salud general de los pacientes. Se utilizó el valor d de Cohen para estimar el tamaño del efecto de la exposición a los fármacos.

Para el estudio de cohortes retrospectivo, se comparó la evolución de los sujetos expuestos o no a I-ECA o antagonistas de AT1 durante los cinco años de seguimiento mediante el método estadístico conocido como “Ecuaciones Generales de Estimación” (GEE). El sexo y

la edad se incluyeron como factores confundentes. Se realizaron comparaciones post-hoc de medias marginales, calculadas por el modelo GEE, en cada punto temporal.

En ambos estudios, el nivel de significancia se estableció convencionalmente en 0.05. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS v.23 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.).

IV. Resultados

a. Estudios en líneas celulares

En la Figura 1 se muestra el efecto de la administración de la neurotoxina 6OHDA sobre la viabilidad de los cultivos de la línea celular SHSY5Y. Se estableció que la DL50, es decir aquella que reducía la viabilidad de los cultivos en un 50%, era de 150 microM. Este valor está en línea con la bibliografía internacional, validando nuestras condiciones experimentales.

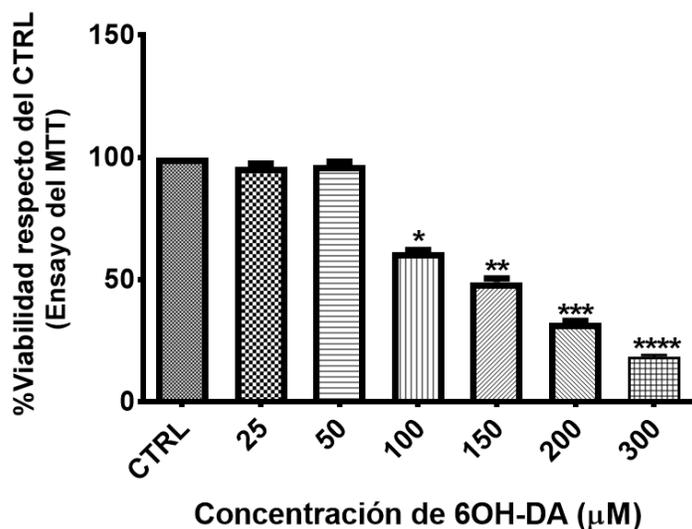


Figura 1. Viabilidad de los cultivos celulares de SHSY5Y tras el agregado de la neurotoxina 6-OHDA o su control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control.

Nuestros resultados muestran que la Angiotensina II reduce la viabilidad neuronal tanto en cultivos tratados con la neurotoxina dopaminérgica 6-hidroxidopamina como en los controles (Figura 2). La dosis de Ang II que redujo a un 50% la viabilidad de los cultivos pre-tratados con 6-OHDA fue de entre 25 y 100 nanoM, estableciéndose la dosis de 50 nanoM para los próximos experimentos.

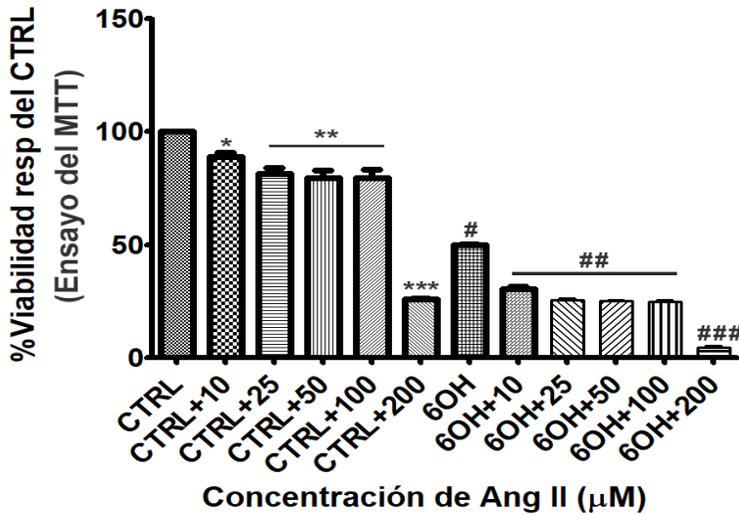


Figura 2. Viabilidad de los cultivos celulares de SHSY5Y tras el agregado de Angiotensina II o su control, luego de la aplicación de la neurotoxina 6-OHDA o su control. * p<0.05, ** p<0.01 vs 6OHDA o control sin angiotensina.

Como se observa en la Figura 3, el pretratamiento con Losartan en dosis de 1, 2, 5 y 10 microM incrementó significativamente la viabilidad celular luego del tratamiento con 6OHDA + Ang II.

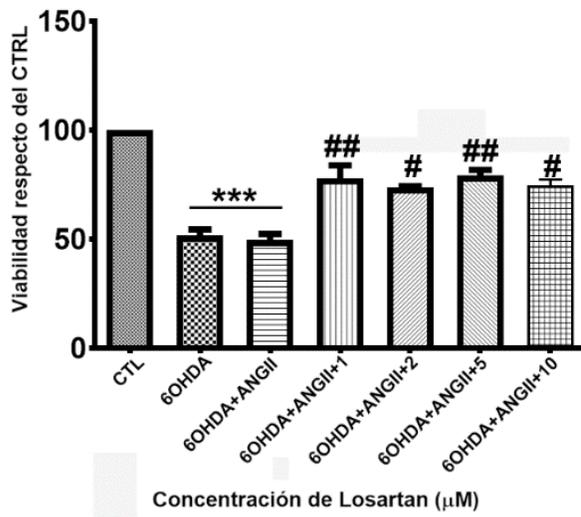


Figura 3. Efectos del Losartan sobre la viabilidad celular en cultivos celulares SHSY5Y, luego de la aplicación de la neurotoxina 6-OHDA o su control. *** p<0.001 vs control. # p<0.05 ## p<0.01 vs 6OHDA (150 mcg) +AngII (50 mcg).

b. Estudios en seres humanos

Estudio de casos y controles.

De los 423 sujetos incluidos en el estudio, 103 (32,1%) iniciaron el tratamiento con L-DOPA (casos) durante el año 1 de seguimiento, mientras que 320 pacientes (67,9%) no lo hicieron (controles). La mediana de tiempo para comenzar con L-DOPA fue de 6 meses (rango intercuartílico, IQR = 5-8 meses). Los casos eran más antiguos que los controles y tenían una

enfermedad de inicio tardío con una gravedad de la enfermedad comparable al inicio del estudio (Tabla 1). Al doceavo mes, 273 de los 423 pacientes (64%) estaban tomando al menos un fármaco antiparkinsoniano, 110 (26%) pacientes estaban siendo tratados con más de 1 fármaco al mismo tiempo. Cinco (1%) pacientes recibieron anticolinérgicos, 34 (8%) con amantadina, 103 (24%) con L-DOPA, 119 (28%) con agonistas de la dopamina y 135 (32%) con inhibidores de la MAO-B. La dosis diaria de L-DOPA fue de $438,1 \pm 274,8$ mg. En esta muestra, 29 (6,9%), 12 (2,8%) y 12 (2,8%) pacientes estuvieron expuestos a I-ECA hidrofílicos, I-ECA lipofílicos y antagonistas de AT1, respectivamente, al inicio del estudio (Tabla 1). Los fármacos más consumidos fueron: lisinopril para I-ECA hidrofílicos (21/29 = 72%), ramipril para I-ECA lipofílicos (5/12 = 41%) y valsartán para AT1 antes (4/12 = 33%).

En la tabla 1 se muestran las características y la exposición a fármacos de interés en casos y controles. No se observaron asociaciones significativas entre la exposición a los I-ECA o bloqueantes AT1 y la progresión clínica de la EP, utilizando el inicio del tratamiento de L-DOPA como marcador subrogante. Sin embargo, los casos expuestos a antagonistas de AT1 mostraron una clara tendencia a un menor riesgo de requerir L-DOPA en comparación con los controles (OR ajustado: 0,26; intervalo de confianza del 95% IC: 0,03-2,18, Tabla 1, resaltado en amarillo) con un valor de Cohen d en el rango medio-alto de 0,74.

Tabla 1. Características de los Casos y controles incluidos en el estudio.

	Muestra total (n=423)	Controles (n=320)	Casos (n=103)	OR (IC 95%) ajustado	Valor p	Cohen d
Características de los pacientes						
Hombres	277 (65%)	211 (66%)	66 (64%)	-	0.73	-
Edad (años)	61.7±9.7	60.6±9.6	65.1±9.4	-	<0.01	-
Edad en el momento del diagnóstico de EP	61.1±9.7	60.1±9.6	64.5±9.3	-	<0.01	-
Duración de la EP (meses)	6.7±8.4	6.7±8.6	6.6±7.7	-	0.94	-
Antecedentes familiares de EP	103 (24%)	84 (26%)	19 (18%)	-	0.10	-
Puntaje Elixhauser de comorbilidades	0.6±2.8	0.6±2.8	0.6±2.9	-	0.95	-
Puntaje MDS-UPDRS II+III	34.9±14.6	34.5±14.2	36.4±15.9	-	0.32	-
Exposición a las drogas						
I-ECA hidrofílicos	29 (6.9%)	20 (6.3%)	9 (8.7%)	1.45 (0.58- 3.59)	0.38	0.21
Duración (años)	8.9±7.0	10.6±7.7	7.2±3.0	1.01 (0.91-1.11)	0.22	0.01
DDEs (mg)	1.8±1.3	1.6±1.3	2.4±1.2	1.25 (0.82-1.91)	0.21	0.12
I-ECA lipofílicos	12 (2.8%)	8 (2.5%)	4 (3.9%)	0.93 (0.23-3.79)	0.46	0.04
Duración (años)	9.9±8.9	7.5±4.3	14.3±14.3	1.04 (0.94-1.14)	0.41	0.02
DDEs (mg)	2.9±2.1	4.9±3.4	2.1±0.8	0.91 (0.62-1.32)	0.10	0.05
Antagonistas AT1	12 (2.8%)	10 (3.1%)	2 (1.9%)	0.26 (0.03-2.18)	0.52	0.74
Duración (años)	6.7±3.2	7.1±3.1	8.5±3.1	0.81 (0.59-1.12)	0.57	0.11
DDEs (mg)	1.5±0.5	1.4±0.7	1.5±0.7	0.39 (0.70-2.32)	0.84	0.52

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (DE) (variables continuas) o frecuencia y porcentaje (variables categóricas). Las comparaciones bivariadas se realizaron mediante una prueba t o una prueba de chi-cuadrado. El modelo ajustado incluyó: edad y sexo de los sujetos, la severidad de la enfermedad al momento de la inclusión (puntaje MDS-UPDRS 2+3) y el puntaje Elixhauser de comorbilidades. El valor Cohen d representa una medida estandarizada del tamaño del efecto (Cohen 1988). PD: enfermedad de Parkinson; MDS-UPDRS: Escala de calificación de la enfermedad de Parkinson unificada por la Sociedad de trastornos del movimiento; I-ECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; DDE: Dosis Diarias Equivalentes.

Estudio de cohortes retrospectivo.

De los 423 sujetos incluidos en el estudio, 348 (83%) estaban disponibles en el año 1, 334 (79%) en el año 2, 320 (76%) en el año 3 y 244 (59%) en el año 4. El número de pacientes expuestos a I-ECA hidrofílicos al inicio del estudio y los años 1, 2, 3 y 4 fueron 29 (7%), 28 (7%), 26 (8%), 25 (8%) y 19 (8%) respectivamente. La exposición acumulada a I-ECA lipofílicos fue de 12 (3%), 11 (3%), 10 (3%), 10 (3%) y 8 (3%), respectivamente. Finalmente, la exposición acumulada a los antagonistas AT1 fue de 12 (3%), 11 (3%), 11 (3%), 9 (3%) y 8 (3%), respectivamente. Las puntuaciones medias \pm desviación estándar de MDS-UPDRS II + III en estas visitas fueron $26,8 \pm 11,1$, $32,0 \pm 13,4$, $34,9 \pm 14,6$, $37,1 \pm 15,5$, $42,0 \pm 17,8$ y $42,7 \pm 17,8$, respectivamente.

El GEE reveló una asociación significativa entre la puntuación MDS-UPDRS II + III y la exposición a los antagonistas AT1 (OR ajustado: 0,88; intervalo de confianza del 95% IC: 0,79-0,98; $p = 0,03$). No se observaron asociaciones significativas con la exposición a los IECA hidrofílicos (0,96, 0,83-1,10; $p=0,54$), o a los IECA lipofílicos (1,07, 0,87-1,31; $p=0,53$). En la figura 1, se muestra con más detalle el efecto de la exposición de los antagonistas AT1 sobre el puntaje MDS-UPDRS 2+3,

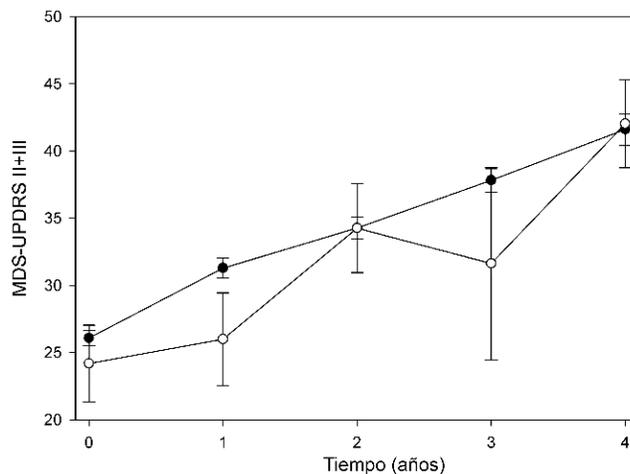


Figura 1. MDS-UPDRS II + III en la "condición OFF definida de manera práctica" en pacientes expuestos (o) o no (●) a AT1 antes. Se muestran las medias marginales estimadas y los errores estándar.

V. Discusión y Conclusión

Si bien el control sintomático de los síntomas motores de la EP se puede lograr mediante el uso de una variedad de medicamentos o dispositivos [40], los tratamientos modificadores de la enfermedad aún no están disponibles. La reutilización de fármacos, utilizando fármacos antiguos y bien conocidos con nuevas indicaciones, puede ofrecer la oportunidad de desarrollar tratamientos modificadores de la EP de forma rápida y rentable. También

tiene la ventaja de identificar señales de efectos relevantes en modelos experimentales y estudios observacionales para su posterior traducción en ensayos clínicos.

Nuestros resultados confirman que tanto 6OHDA como Ang II reducen la viabilidad en la línea celular SHSY5Y y en el caso de la Ang II esta reducción está asociada probablemente a la activación del receptor AT1, ya que el pretratamiento con bloqueantes AT1 revirtió parcialmente esta reducción en la viabilidad tanto para 6OHDA como para Ang II.

En el subestudio de casos y controles no se observaron asociaciones significativas entre la exposición a los I-ECA o bloqueantes AT1 y la progresión clínica de la EP, utilizando el inicio del tratamiento de L-DOPA como marcador subrogante durante el primer año. Si bien no se observaron diferencias significativas, se detectó una tendencia a una menor exposición a los bloqueantes AT1 en los casos en comparación a los controles. Si bien el efecto fue marcado, con un valor Cohen d (0.74) en el rango de efecto medio-alto, el tamaño muestral resultó insuficiente para que el mismo fuera estadísticamente significativo. Además, se observó un efecto de tamaño medio no significativo de la dosis de bloqueantes AT1, lo que refuerza la sospecha de un potencial efecto neuroprotector dosis dependiente.

En el subestudio de cohorte retrospectivo se observaron asociaciones significativas entre los puntajes MDS-UPDRS 2+3, que indican la severidad de la enfermedad, inferiores en sujetos expuestos a los bloqueantes AT1, en comparación a los que no se registró exposición. Estas observaciones son compatibles con un posible efecto modificador de la enfermedad de los mismos. No se observaron diferencias relevantes en relación a la exposición a los I-ECA. Debe sin embargo destacarse que la exposición a I-ECA lipófilicos se asociaron a una evolución más tórpida del puntaje de severidad de la afectación autónoma (SCOPA-Aut).

Estos resultados pueden interpretarse como una clara señal de que la administración de bloqueantes del receptor AT1 podría relacionarse con una evolución más lenta de la Enfermedad de Parkinson, sugiriendo así un efecto terapéutico.

Tanto en el estudio básico en línea celular como en el estudio epidemiológico en seres humanos se evidenció el efecto neuroprotector del pretratamiento con antagonistas AT1 a la lesión con toxina dopaminérgica y el agregado de Ang II en cultivos celulares así como también en la mejora del puntaje MDS-UPDRS II+III en los casos respecto de los controles. Los resultados de este enfoque traslacional se complementan mutuamente entre sí y abren una línea de investigación que podría derivar en nuevos medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Se puede hipotetizar que la activación del receptor de Ang II AT2 podría ser responsable del efecto neuroprotector observado en nuestros experimentos.

VI. Bibliografía

1. Dorsey, E.R., et al., *Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030*. *Neurology*, 2007. **68**(5): p. 384-386.
2. Bauso, D.J., et al., *Incidence and prevalence of Parkinson's disease in Buenos Aires City, Argentina*. *Eur J Neurol*, 2012. **19**(8): p. 1108-13.
3. Strickland, D. and J.M. Bertoni, *Parkinson's prevalence estimated by a state registry*. *Mov Disord*, 2004. **19**(3): p. 318-23.
4. von Campenhausen, S., et al., *Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2005. **15**(4): p. 473-90.
5. Kalia, L.V. and A.E. Lang, *Parkinson's disease*. *Lancet*, 2015. **386**(9996): p. 896-912.
6. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. *Neurobiol Aging*, 2003. **24**(2): p. 197-211.
7. Del Tredici, K., et al., *Where does parkinson disease pathology begin in the brain?* *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002. **61**(5): p. 413-26.
8. McDonald, C., et al., *200 Years of Parkinson's disease: what have we learnt from James Parkinson?* *Age Ageing*, 2018. **47**(2): p. 209-214.
9. Linazasoro, G., *Recent failures of new potential symptomatic treatments for Parkinson's disease: causes and solutions*. *Mov Disord*, 2004. **19**(7): p. 743-754.
10. Lu, J., et al., *Angiotensin AT2 receptor stimulation inhibits activation of NADPH oxidase and ameliorates oxidative stress in rotenone model of Parkinson's disease in CATH.a cells*. *Neurotoxicol Teratol*, 2015. **47**: p. 16-24.
11. Hofman, A., et al., *Epidemiology of neurological diseases in elderly people: what did we learn from the Rotterdam Study?* *Lancet Neurol*, 2006. **5**(6): p. 545-50.
12. Lunenfeld, B. and P. Stratton, *The clinical consequences of an ageing world and preventive strategies*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2013. **27**(5): p. 643-59.
13. Lutz, W., W. Sanderson, and S. Scherbov, *The coming acceleration of global population ageing*. *Nature*, 2008. **451**(7179): p. 716-9.
14. Maresova, P., et al., *Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Expected Economic Impact on Europe-A Call for a Uniform European Strategy*. *J Alzheimers Dis*, 2016. **54**(3): p. 1123-1133.
15. Labandeira-Garcia, J.L., et al., *Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability*. *Front Neuroanat*, 2014. **8**: p. 67.
16. Simonnet, G. and M.F. Giorguieff-Chesselet, *Stimulating effect of angiotensin II on the spontaneous release of newly synthesized [3H]dopamine in rat striatal slices*. *Neurosci Lett*, 1979. **15**(2-3): p. 153-8.
17. Mendelsohn, F.A., T.A. Jenkins, and S.F. Berkovic, *Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats*. *Brain Res*, 1993. **613**(2): p. 221-9.
18. Brown, D.C., et al., *Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo*. *Br J Pharmacol*, 1996. **118**(2): p. 414-20.
19. Mertens, B., et al., *Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation decreases dopamine synthesis in the rat striatum*. *Neuropharmacology*, 2010. **58**(7): p. 1038-44.
20. Jenkins, T.A., F.A. Mendelsohn, and S.Y. Chai, *Angiotensin-converting enzyme modulates dopamine turnover in the striatum*. *J Neurochem*, 1997. **68**(3): p. 1304-11.
21. Perez-Lloret, S., et al., *Renin-angiotensin system as a potential target for new therapeutic approaches in Parkinson's disease*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017. **26**(10): p. 1163-1173.
22. Zawada, W.M., et al., *Loss of angiotensin II receptor expression in dopamine neurons in Parkinson's disease correlates with pathological progression and is accompanied by*

- increases in Nox4- and 8-OH guanosine-related nucleic acid oxidation and caspase-3 activation. Acta Neuropathol Commun*, 2015. **3**: p. 9.
23. Reardon, K.A., et al., *The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, modifies the clinical features of Parkinson's disease. Aust N Z J Med*, 2000. **30**(1): p. 48-53.
 24. Lee, Y.C., et al., *Antihypertensive agents and risk of Parkinson's disease: a nationwide cohort study. PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98961.
 25. Ritz, B., et al., *L-type calcium channel blockers and Parkinson disease in Denmark. Ann Neurol*, 2010. **67**(5): p. 600-6.
 26. Warda, A., et al., *The association between antihypertensive therapy and the incidence of Parkinson's disease in patients followed in general practices in Germany. Int J Clin Pharmacol Ther*, 2019. **57**(10): p. 483-488.
 27. Kalia, L.V. and A.E. Lang, *Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. Nat Rev Neurol*, 2016. **12**(2): p. 65-6.
 28. Rodriguez-Blazquez, C., et al., *Estimating the direct and indirect costs associated with Parkinson's disease. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 2015. **15**(6): p. 889-911.
 29. Dwoskin, L.P., A.L. Jewell, and L.A. Cassis, *DuP 753, a nonpeptide angiotensin II-1 receptor antagonist, alters dopaminergic function in rat striatum. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1992. **345**(2): p. 153-9.
 30. Mertens, B., et al., *The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2010. **11**(1): p. 49-56.
 31. Villar-Cheda, B., et al., *Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. Eur J Neurosci*, 2010. **32**(10): p. 1695-706.
 32. Villar-Cheda, B., et al., *Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. Neurobiol Aging*, 2014. **35**(7): p. 1726-38.
 33. Rascol, O., et al., *Falls in ambulatory non-demented patients with Parkinson's disease. J Neural Transm (Vienna)*, 2015. **122**(10): p. 1447-55.
 34. Joglar, B., et al., *The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. J Neurochem*, 2009. **109**(2): p. 656-69.
 35. Ge, J. and N.M. Barnes, *Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. Eur J Pharmacol*, 1996. **297**(3): p. 299-306.
 36. Jing, X., et al., *Dimethyl fumarate attenuates 6-OHDA-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and in animal model of Parkinson's disease by enhancing Nrf2 activity. Neuroscience*, 2015. **286**: p. 131-40.
 37. Xicoy, H., B. Wieringa, and G.J. Martens, *The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. Mol Neurodegener*, 2017. **12**(1): p. 10.
 38. Grammatopoulos, T.N., et al., *Angiotensin II protects cultured midbrain dopaminergic neurons against rotenone-induced cell death. Brain Res*, 2005. **1045**(1-2): p. 64-71.
 39. Parkinson Progression Marker, I., *The Parkinson Progression Marker Initiative (PPMI). Prog Neurobiol*, 2011. **95**(4): p. 629-35.
 40. Fox, S.H., et al., *International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. Mov Disord*, 2018. **33**(8): p. 1248-1266.

Participación en Congresos, Jornadas o Reuniones científicas

Los resultados fueron comunicados en las Jornada Científica del Instituto Universitario Barcelo en 2018 y 2019. Los resultados serán presentados al próximo congreso internacional de Parkinson y estamos en proceso de elaborar la publicación.

Viajes realizados por el equipo de investigadores (Para la presentación de avances del trabajo en el exterior e interior del país)

NINGUNO

Formación de recursos humanos (Becarios, pasantes, alumnos en el proyecto): actividades

- Nombre de becarios y/o alumnos

Camila Guimaraes.

- Detalle de actividades desarrolladas

Asistió en el desarrollo de los cultivos celulares y de la prueba del MTT.

Subsidios recibidos (fuentes del IUCS y externas).

Se ha recibido un subsidio del IUCS por tres años. Además, el estudio clínico ha sido parcialmente subsidiado por la Fundación Roemmers.