

Sección: Artículos originales

Efectos de la flunarizina en la malaria cerebral experimental

Juan Francisco Maya, M.D. M.Sc.¹, Aura Mariela Pantoja, M.Sc.², Hernán Ramírez, M.D.³, Sócrates Herrera, M.D.⁴

RESUMEN

Se estudiaron 40 ratones albino suizos adultos con edades entre 11-12 semanas y pesos de 40 ± 2 g a los que se les produjo malaria experimental con *Plasmodium berghei* var anka y se dividieron en 3 modalidades terapéuticas: flunarizina, cloroquina, cloroquina-flunarizina y un grupo control sin tratamiento. El estudio neuropatológico mostró un efecto protector en el grupo tratado con cloroquina-flunarizina al compararlo con el grupo tratado con cloroquina sola, mediante la prueba de Fischer ($p < 0.01$). La elevada morbilidad de la malaria cerebral justificaría la utilización de agentes bloqueadores de los canales de calcio selectivos para el sistema nervioso central, como la flunarizina, en ensayos clínicamente controlados, como conducta adyuvante al tratamiento antimalárico.

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Plasmodium*¹. En Colombia y otros países, dentro de sus complicaciones más severas está la malaria cerebral que se acompaña de hipoxia e isquemia y elevada morbilidad¹⁻⁴. En estos estados patológicos como también en los procesos metabólicos normales del *Plasmodium*, las concentraciones de calcio intracelular juegan un papel importante⁵⁻⁷.

Se sabe que el calcio actúa como un segundo mensajero o mediador intracelular común a la acción de sustancias producidas en diversos procesos inflamatorios, p.e., el factor de necrosis tumoral¹⁻⁷, que pueden conducir finalmente a la muerte tisular; además, es necesario en concentraciones óptimas para la proliferación intracelular del parásito^{7,8}.

Por estas razones se decidió ensayar la posible acción te-

rapéutica de la flunarizina⁹⁻¹¹ como agente bloqueador selectivo de canales de calcio para el sistema nervioso central en un modelo experimental de malaria en ratones.

MATERIAL Y METODOS

Todos los experimentos se hicieron en ratones albinos suizos tomados del bioterio del Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia, con edades entre 11-12 semanas y pesos de 40 ± 2 g.

Se estableció una fase preliminar para determinar toxicidad aguda, prueba de Irwin, desarrollo de malaria experimental con *P. berghei* var anka¹² y dosis por utilizar. Para el modelo experimental se emplearon 4 grupos de 10 ratones cada uno inoculados por vía intraperitoneal con 1'000,000 de glóbulos rojos parasitados por *P. berghei* de acuerdo con el siguiente esquema: a) grupo control sin tratamiento; b) flunarizina, 40 mg/kg; c) cloroquina, 20 mg/kg; d) cloroquina-flunarizina, 20 mg/kg-40 mg/kg, respectivamente.

Los fármacos utilizados fueron cloroquina base pura en polvo (Laboratorios Sydney Ross, Cali) y diclorhidrato de flunarizina (Bussie SA, Bogotá) que se administraron con sonda orogástrica, diluidos en agua destilada en un volumen de 0.25 ml/10 g de ratón cada 24 horas.

A todos los grupos se les determinó parasitemia cada 24 horas a partir del cuarto día post-inoculación. El tratamiento descrito, se inició desde el cuarto día y por espacio de 6 días. La necropsia consistió en extraer cerebro, riñón, bazo e hígado, órganos que se fijaron en formol amortiguado al 10% para posteriormente hacer cortes macroscópicos de 3 mm con inclusión en parafina. Los cortes histológicos se hicieron de 5 μ m y se colorearon con Giemsa y hematoxilina-eosina.

Los hallazgos histopatológicos en hipotálamo, tálamo, hipocampo, ventrículo lateral, tercer ventrículo y corteza cerebral se clasificaron así:

Grado 0. Cortes histológicos normales.

Grado 1. Congestión que afecta una pequeña proporción de

1. Profesor Asistente, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
2. Profesora Asociada, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Profesor Asociado, Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
4. Profesor Titular, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

vasos intracraneales.

Grado 2. Congestión intracraneal generalizada y en meninges, con aglutinación de eritrocitos parasitados, edema cerebral y hemorragia extensa.

Grado 3. Congestión intracraneal generalizada y en meninges, con aglutinación de eritrocitos parasitados, edema cerebral y hemorragia extensa.

Los hallazgos histopatológicos se analizaron mediante la prueba de Fischer de las cuatro casillas. Asimismo, se empleó el programa ANOVA.

RESULTADOS

Con las dosis superiores a DL_{50} de cloroquina (411 ± 40 mg/kg), se observaron temblores, aumento de la frecuencia respiratoria y fenómeno de Straub (erección de la cola).

Con las dosis superiores a DL_{50} de flunarizina (1115 mg/kg ratón), no se observaron alteraciones al aplicar la prueba de Irwin que valora los efectos farmacológicos de un medicamento en animales de experimentación. A partir del quinto día post-inoculación de los eritrocitos parasitados, se presentaron en 80% de los animales los siguientes signos neurológicos: ataxia, convulsiones tónico-clónicas generalizadas, paresias, plejias y cambios en el comportamiento, que no tenían relación con el grado de parasitemia.

La parasitemia se empezó a demostrar a partir del cuarto día y aumentó progresivamente hasta comprometer 80% de los eritrocitos en el grupo control.

En los grupos tratados con cloroquina y cloroquina-flunarizina se observó una disminución de la parasitemia que fue más marcada en las primeras 24 horas después de iniciado el tratamiento con la combinación de sustancias (Figura 1). Al analizar este resultado por ANOVA de doble vía, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

La mortalidad acumulada mostró que el período más crítico en los grupos tratados con flunarizina y en los controles, correspondió a los días quinto y sexto, donde hubo 60% de la mortalidad. No se encontró diferencia entre los grupos. En los cortes de cerebro correspondientes se observó edema marcado de tipo perivascular, intersticial y perineuronal, acompañado de congestión vascular severa, alta parasitemia intravascular y cambios degenerativos neuronales de tipo isquémico (Figuras 2-6). Estos hallazgos no presentaron diferencia estadísticamente significativa.

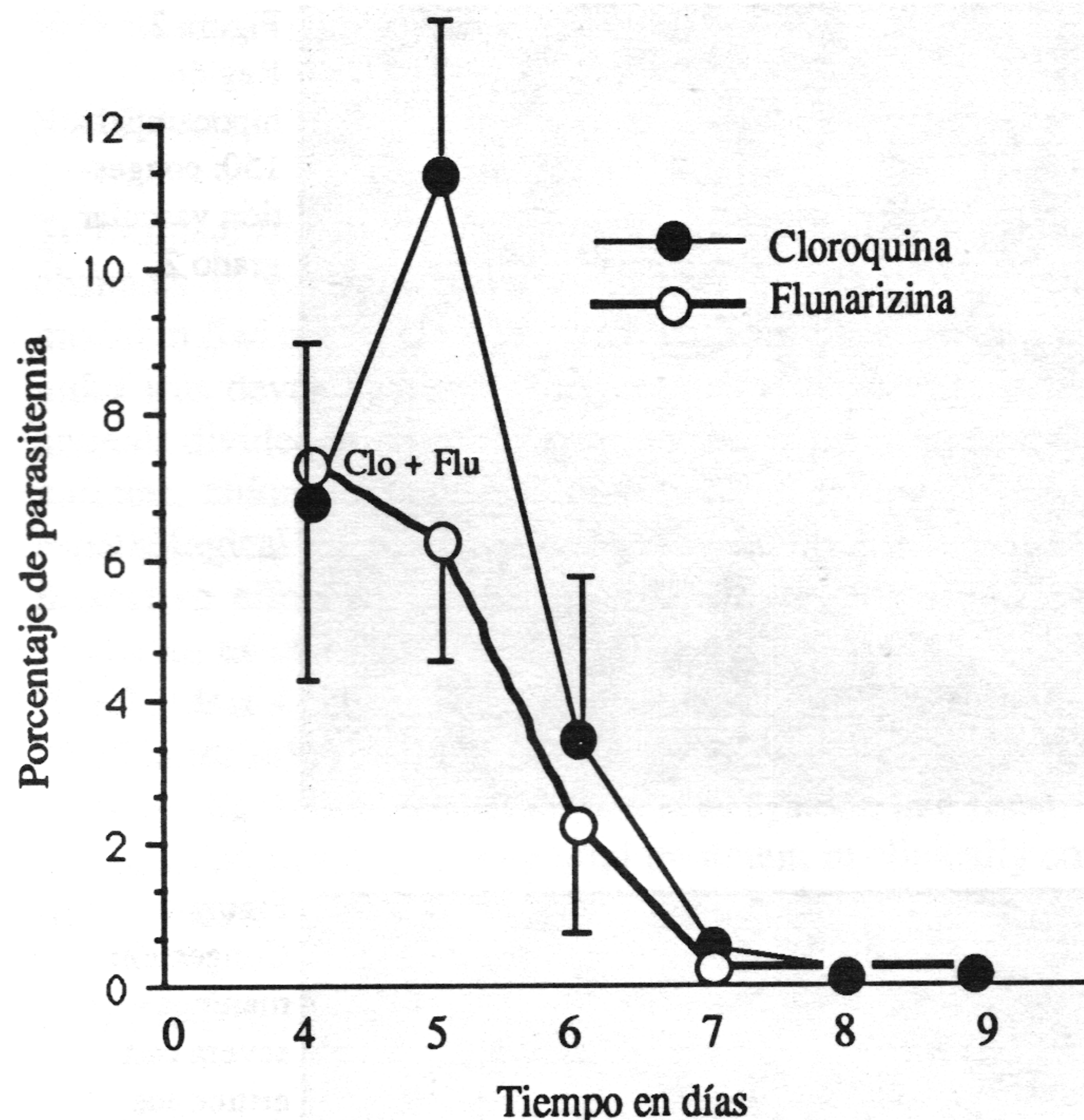


Figura 1. Efecto de la cloroquina más flunarizina sobre el porcentaje de parasitemia.

En los cortes histopatológicos de los ratones tratados con cloroquina y cloroquina-flunarizina hubo en algunos casos daños similares a los que se acaban de describir, mientras que en otros no se encontró ningún grado de alteración patológica (Figura 7). El análisis de los resultados mediante la prueba de Fischer, reveló una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p < 0.001$) a favor del grupo que recibió flunarizina y cloroquina simultáneamente.

DISCUSION

La malaria cerebral es una de las complicaciones más comunes y la mayor causa de muerte producida por *P. falciparum*^{13,14}. La Organización Mundial de la Salud, define la malaria cerebral como un coma no explicable con exclusión de otras encefalopatías y confirmación de la infección por *P. falciparum*; sin embargo, hay autores^{15,16} que no siguen estrictamente estos criterios. Otros¹³ encuentran en la malaria cerebral alteraciones de la conciencia (anormalidad neurológica más frecuente), síndrome mental orgánico con confusión y desorientación, movimientos anormales y cambios agudos de la personalidad; los signos neurológicos focales son raros y transitorios.

En relación con la fisiopatología Grau et al.¹⁷ culpan al factor de la necrosis tumoral (FNT) como inductor de la malaria

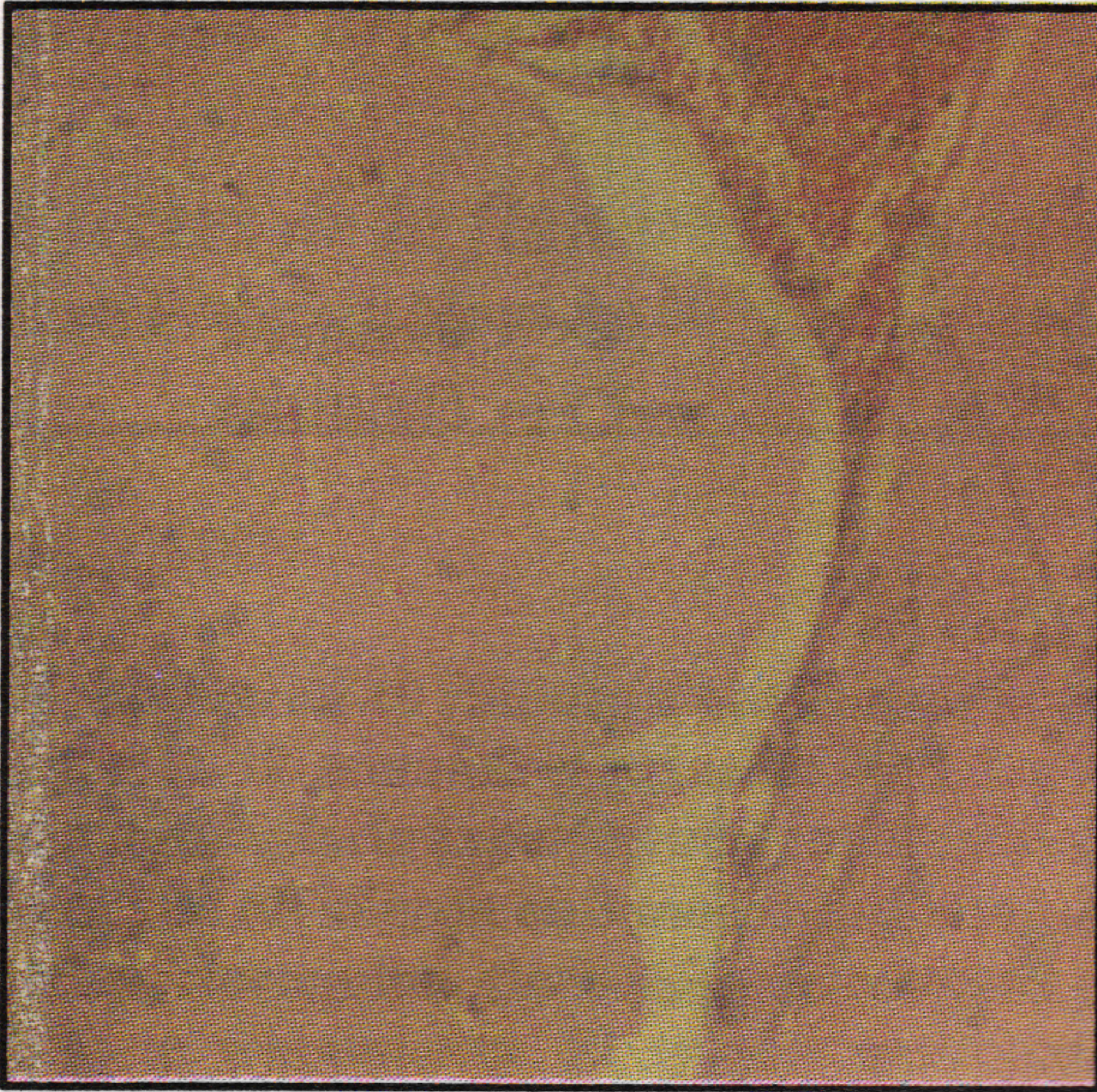


Figura 2.
Región
hipocampal x
150: conges-
tión vascular
grado 2.

Figura 3.
Región
ependimaria x
300: hemorragia
severa grado 3.

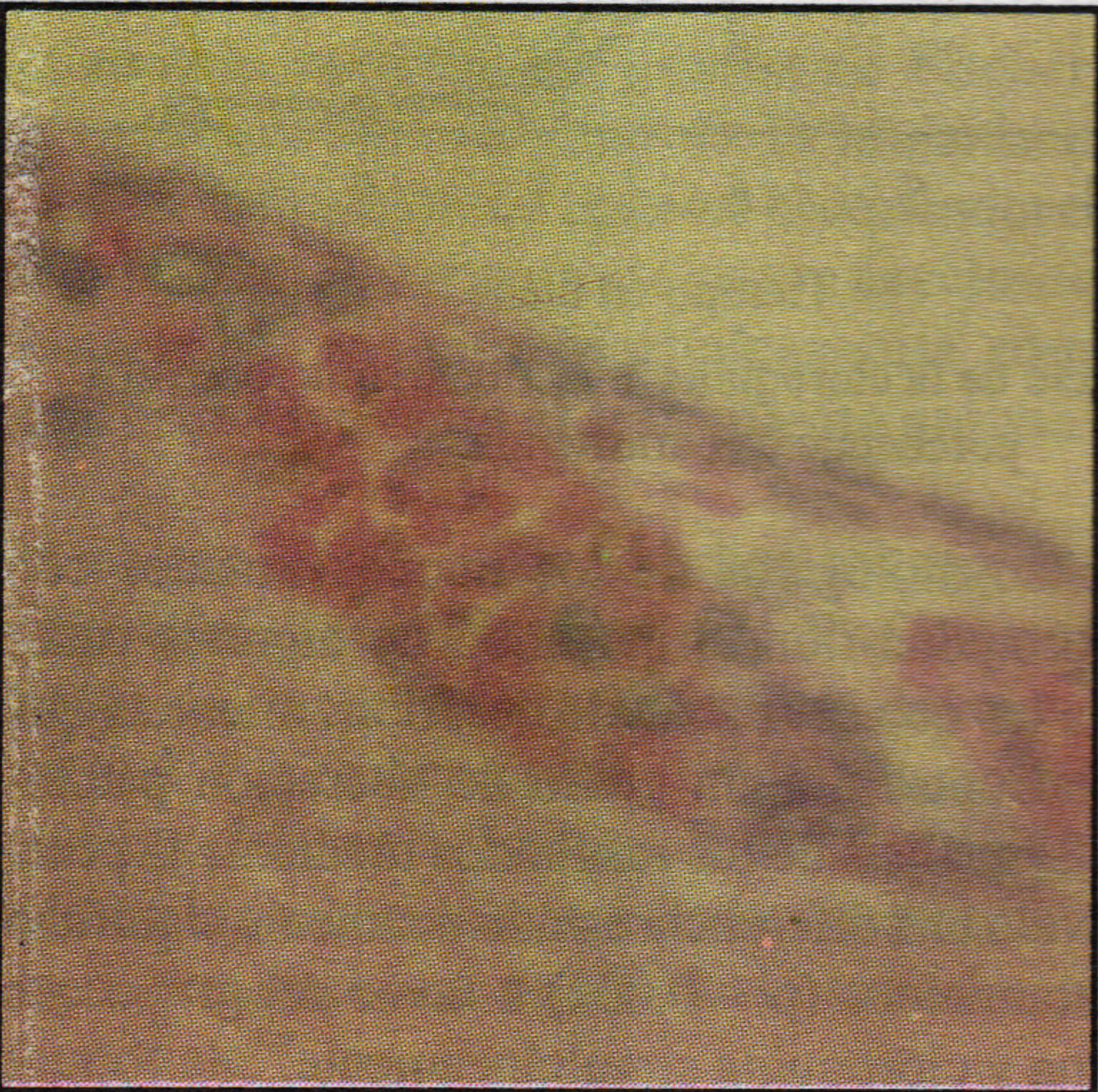
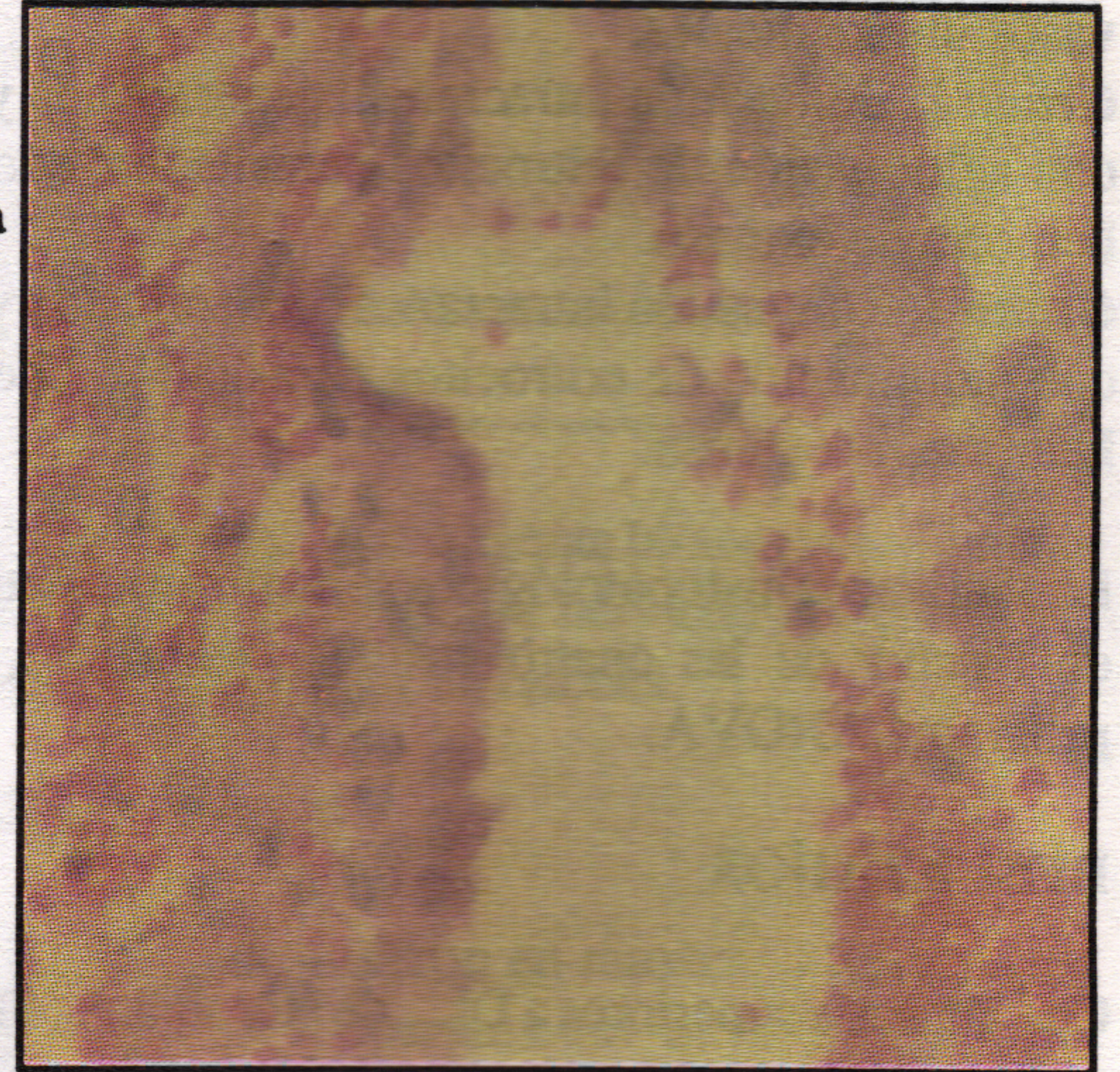


Figura 4.
Congestión
meníngea
severa con
eritrocitos
parasitados.
HE x 600.

Figura 5.
Eritrocitos para-
sitados, daño
endoetial y
edema peri-
vascular severos
x 1000.

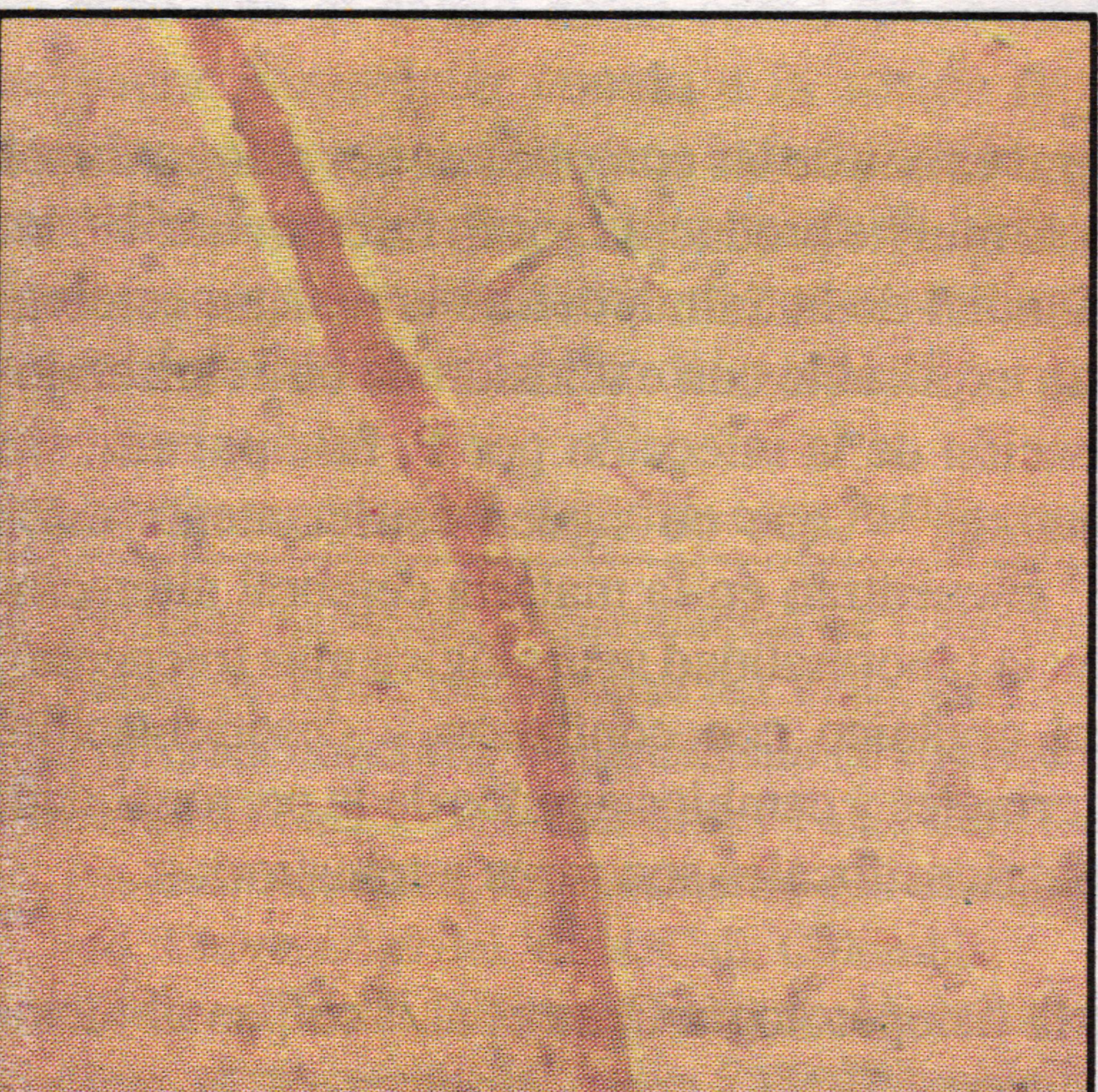
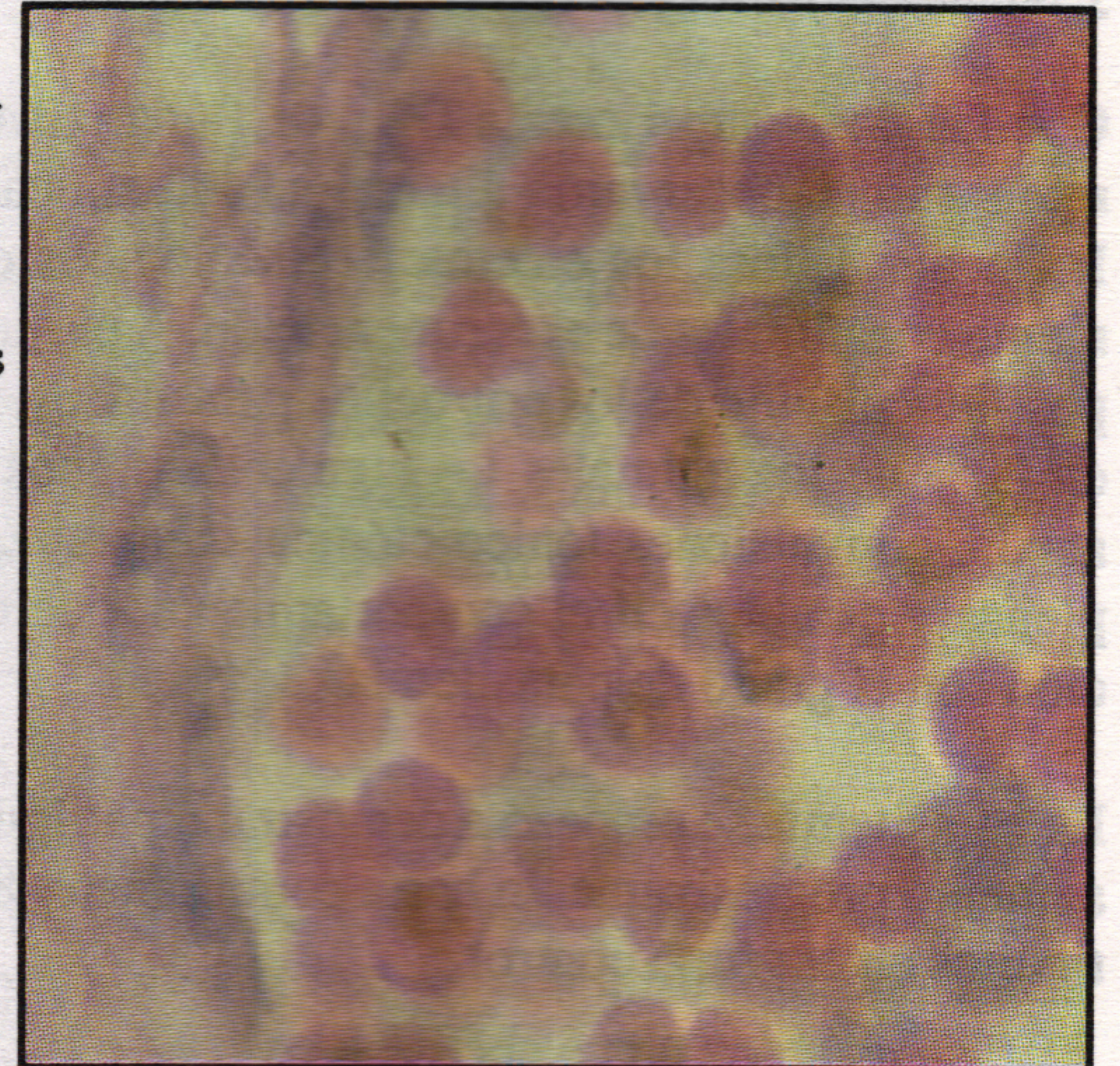
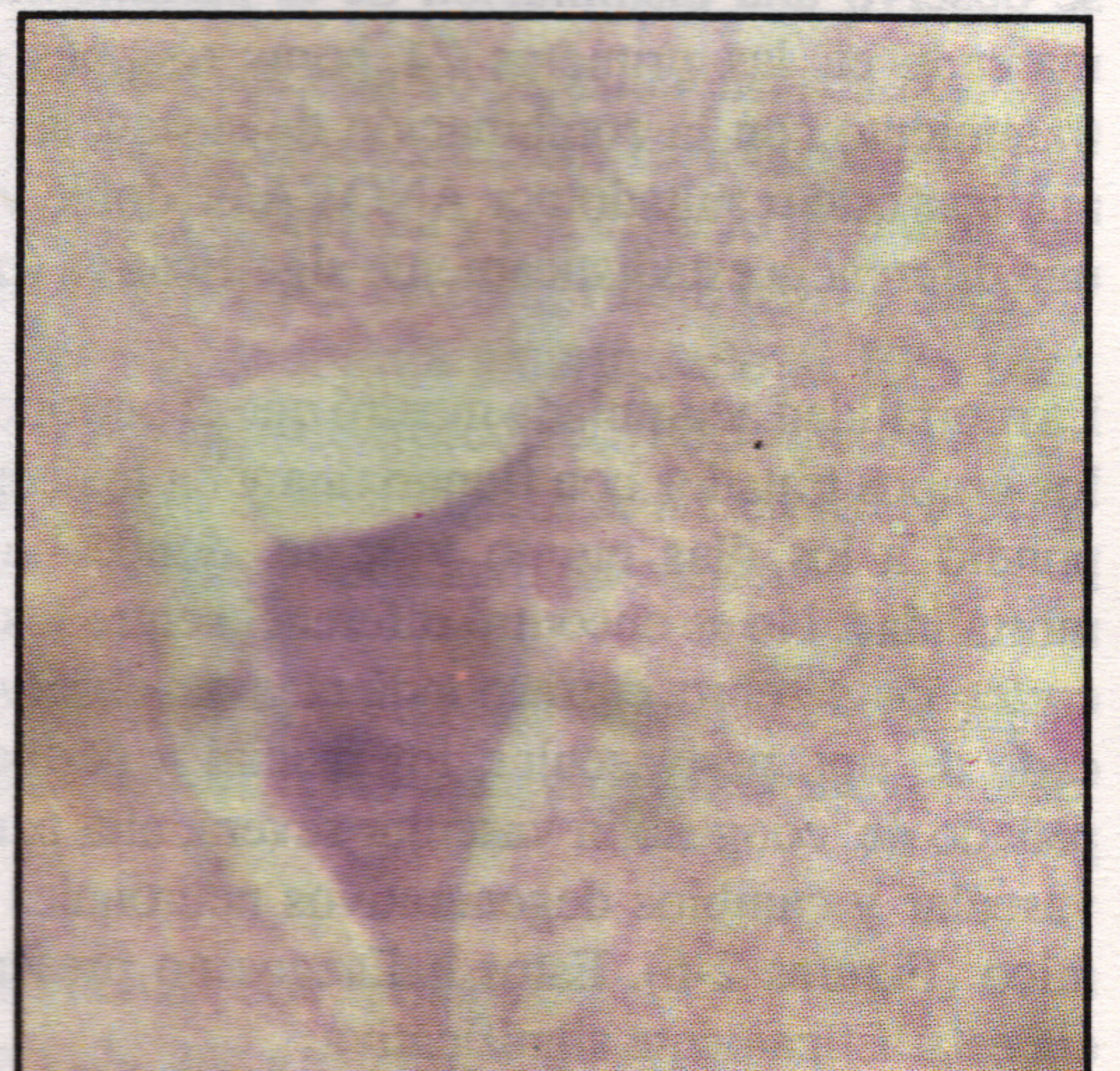


Figura 6.
Daño neuronal
hipóxico x
1000.

Figura 7.
Núcleos basa-
les: congestión
leve x 150
(cloroquina-
flunarizina).



cerebral. El calcio extracelular juega un papel importante en la invasión del parásito a los glóbulos rojos, pues cuando, se reduce experimentalmente, disminuye su desarrollo y el ataque a otros eritrocitos^{7,8}. En la hipoxia e isquemia cerebral (presentes en la malaria cerebral) se ha visto el papel del calcio como ion importante para el desencadenamiento de acciones fisiológicas que redundan en más daño neurológico, pues en la unión a proteínas, y la acción como segundo mensajero, entre otras, hace que se activen o liberen sustancias que alteran más el medio celular¹⁸⁻²².

Los bloqueadores de los canales de calcio tienen un amplio espectro de actividades y se usan en el manejo clínico de afecciones cardiovasculares y neurológicas^{5,6,19,23,24}. Su mecanismo de funcionamiento se atribuye a que interactúa con canales dependientes de voltaje tipo N, L y T²⁵. Sin embargo, los calcio-antagonistas obran con otras proteínas, incluyendo una bomba de flujo dependiente de adenosín-trifosfato (p-glicoproteína)²⁶. También sus propiedades se han investigado en los procesos para revertir la resistencia a ciertas drogas como los alcaloides de la vinca, astraciclinas y para tratar la malaria cloroquina-resistente.

Lo anterior hace suponer que acciones ejercidas con un bloqueador de calcio selectivo para el sistema nervioso central como la flunarizina, pueden alterar procesos patológicos específicos como la hipoxia, la isquemia cerebral y el desarrollo del *Plasmodium*.

Histopatológicamente al evaluar los cortes de cerebro, en el modelo experimental, se encontró un efecto protector en el grupo tratado con cloroquina-flunarizina en comparación con el grupo que recibió cloroquina sola. Sin embargo, la evidencia morfológica en microscopía de luz no refleja el estado verdadero de lo que ocurre a nivel molecular, y que indicaría con más exactitud si hay un efecto real entre los distintos tratamientos.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la mortalidad en los grupos tratados con cloroquina sola y flunarizina-cloroquina; las curvas de parasitemia obtenidas para cloroquina-flunarizina muestran una disminución en el punto máximo de parasitemia, estadísticamente significativa en relación con la curva de cloroquina.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Alberto Alzate y Hans Dahners, Departamento de Microbiología y Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia, por

toda su ayuda para el desarrollo del presente proyecto.

SUMMARY

To evaluate flunarizine effects a selective blocker of calcium channels in cerebral malaria, flunarizine, an experimental model in Swiss mice infected with *Plasmodium berguei* var *anka* was developed, with forty age and weight standardized animals divided in four therapeutic groups: no treatment, flunarizine, chloroquine and chloroquine-flunarizine. The neuropathological examination showed a statistically significant protective effect in the group with chloroquine-flunarizine treatment as compared to the group with chloroquine alone (Fischer test < 0.01). The elevated morbimortality of human cerebral malaria should justify the use of selective blockers of calcium channels in the central nervous system, like flunarizine, as an adjuvant to antimalarial treatment in clinically controlled trials.

REFERENCIAS

1. Betancourt, S, Ricaurte, B & Ramírez, M. Malaria cerebral. *Antioquia Med*, 1974, 24: 27-34.
2. Bray, RS & Garnhan, PC. The life cycle of primate malaria parasites. *Br Med Bull*, 1982, 38: 117-122.
3. Doroff, R, Deller, J, Kastl, A & Blocher, W. Cerebral malaria. *JAMA*, 1967, 202: 679-682.
4. Toro, G & Román, G. Cerebral malaria. *Arch Neurol*, 1978, 35: 271-275.
5. Berger, L & Hakim, AM. Calcium channel blockers correct acidosis in ischemic rat brain without altering cerebral blood flow. *Stroke*, 1988, 19: 1257-1261.
6. Cohan, SL. Pharmacology of calcium antagonist: clinical relevance in neurology. *Eur Neurol*, 1990, 30: 28-30.
7. Krungrai, Y & Youngyuth, Y. Enhanced calcium uptake by mouse erythrocytes in malaria (*P. berghei*) infection. *Mol Biol Parasitol*, 1983, 7: 227-235.
8. Krishna, S & Squire-Pollard, L. Calcium metabolism in malaria infected erythrocytes. *Parasitol Today*, 1990, 6: 196-198.
9. Van, RJ & Borgers, M. Ischemic brain injury and cell calcium: morphology and therapeutic aspects. *Ann Emerg Med*, 1985, 14: 736-742.
10. Wauquir, A, Ashton, D, Clincke, G & Edmons, N. *Protective and resucitative properties on flunarizine*. P. 32. Fifth International Meeting of the International Society for Development of Neurosciences, Chieti, 1984.
11. Wauquir, A, Ashton, D, Clincke, G & Fransen, J. *Calcium entry blockers and tissue protection*. Pp. 163-172. Godfrain, T (ed.). Raven Press, New York, 1985.
12. Mackey, LJ, Hochman, A & Lambert, PH. Immunopathological aspects of *P. berghei* infection in five strains of mice II. Immunopathology of cerebral and other tissue lesions during the infection.

13. Godfraind, T. Pharmacological basis of the classification of calcium antagonists. *Acta Otolaryngol*, 1988, 460: 33-45.
14. Kean, BH & Reilly, PC. Malaria the mime. *Am J Med*, 1976, 61: 159-164.
15. Jerusalem, C, Polder, T, Wyers-Rown, M et al. Comparative clinical and experimental study on the pathogenesis of cerebral malaria. *Contrib Microbiol Immunol*, 1983, 7: 130-138.
16. Kean, BH. Cloroquine falciparum malaria from Africa. *JAMA*, 1979, 241: 395-399.
17. Grau, EG, Fajardo, LF, Piquet, PF, Allet, B, Lambert, PIT & Vasalle, P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science*, 1987, 237: 1210-1212.
18. Trevor, JM & Riuk, TJ. Receptor-mediated calcium entry: diversity of function and mechanism. *TIPS*, 1989, 10: 8-11.
19. Leydein, PD, Kocher, A, Ziven, JA & Mozzarella, E. Effects of calcium channel blockers on neurologic outcome after focal ischemia in rabbits. *Stroke*, 1988, 19: 1020-1026.
20. Spedding, M, Mikkelsen, RB & Wallachi, DF. Calcium transport of *P. chabaudi* infected erythrocytes. *J Cell Biol*, 1982, 93: 680-684.
21. Thayler, SA, Hirling, LD & Miller, JR. Distribution of multiple types of calcium channels in rat sympathetic neurons in vitro. *Mol Pharmacol*, 1987, 32: 579-586.
22. Wasserman, M, Alarcón, C & Mendoza, P. Effects of calcium depletion on the asexual cell cycle of *P. falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 1982, 31: 711-717.
23. Hulser, PJ, Koarnhuber, AW & Koarnhuber, HH. Treatment of acute stroke with calcium antagonists. *Eur Neurol*, 1990, 30: 35-38.
24. Townley, RG. The role of calcium channel blockers in reactive air way disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1988, 522: 732-745.
25. Nowycky, MC, Aaron, PF & Tsien, RW. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 1985, 316: 440-443.
26. Spedding, M. Three types of calcium channels explain discrepancies. *TIPS*, 1987, 8: 115-117.
27. Kyle, ED, Ayoade, MJ, Martin, SK & Milhaus, WK. *Plasmodium falciparum*: modulation by calcium antagonists of resistance to cloroquine, desethylcloroquine, quinine and quinidine in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1990, 84: 283-289.

Cómo prevenir conductas transgresoras en adolescentes. Programa genérico.

I. La familia en el colegio.

Carlos E. Climent, M.D.¹, Lida de Aragón², Hernán Rincón, M.D.³, José Francisco Vidal, M.D.³, Carlos Miranda, M.D.⁴

RESUMEN

Este artículo describe una estrategia familiar para previr la drogadicción y otras conductas transgresoras a nivel del colegio. Durante 10 sesiones nocturnas de 2 horas cada una, y en forma vivencial se trataron entre otros los temas de comunicación, sexualidad, valores, factores de riesgos. Se reunieron grupos de padres e hijos del curso octavo de bachillerato de un colegio privado mixto de Cali. Se realizaron sesiones para discutir aspectos asociados con el uso de drogas, según investigaciones previas. Para evaluar el impacto de las sesiones se utilizaron varios instrumentos

estandarizados; en algunos de éstos no hubo variaciones estadísticas significativas, probablemente por tratarse de grupos muy pequeños. El análisis evaluativo final y la revisión del cuestionario de opiniones, mostraron que casi todos los participantes se beneficiaron de las sesiones. Para todos ellos esta fue la primera oportunidad de tratar temas fundamentales de importancia en la vida familiar. Otro beneficio consistió en observar cómo para muchas familias sanas era leve lo que en ellas otros consideraban como extremadamente grave. El haber compartido en forma vivencial con otras familias muchas dificultades familiares y darse cuenta cómo los problemas complicados se trataban con naturalidad, ayudó a los padres a disminuir la intensidad trágica con que miraban el futuro de sus hijos.

Las conductas transgresoras, entre las que se cuentan la drogadicción y la violencia, se asocian con multiplicidad de factores biológicos, psicológicos y sociales. Una forma práctica de enfocar el complejo problema en la prevención de las conductas transgresoras, es dirigir los esfuerzos a buscar un cambio de los factores de riesgo que sean objetivamente identificables y

1. Profesor Titular, Jefe, Departamento de Psiquiatría, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
2. Profesora Asistente, Departamento de Psiquiatría, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Residente, Departamento de Psiquiatría, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
4. Jefe, Salud Mental, Secretaría de Salud Departamental, Cali, Colombia.