



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

REGULACIÓN NERVIOSA DEL SISTEMA INMUNE:
APLICACIONES FARMACOLÓGICAS

Autora: Irene Pereira González

Tutor: Luis Miguel Bedoya del Olmo

Fecha: Junio 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
2.1. Integración entre el sistema inmune y nervioso	4
2.2. Vías de regulación del sistema inmune	5
2.2.1. CAIP (Vía colinérgica Antiinflamatoria)	5
2.2.2. HPA (Hipófisis-Pituitaria-Adrenal)	10
2.2.3. Adrenérgica	10
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	12
a) Intervención farmacológica a nivel del reflejo antiinflamatorio	13
b) Efecto de la inflamación en el SNC.	14
c) Intervención farmacológica en la regulación adrenérgica	16
6. DISCUSIÓN	17
7. CONCLUSIONES	18
8. BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN

El Sistema Nervioso desarrolla una función esencial en la regulación del Sistema Inmune. Esta regulación se realiza por mecanismos hormonales y neurales a través de tres vías: eje HPA (hipófisis-pituitaria-adrenal), regulación simpática y regulación vagal. Dentro de estas rutas, las dos últimas son las que implican mecanismos neurales complejos y por ello se abordan de manera detallada. Para ello es esencial el estudio de la influencia del nervio vago y de las catecolaminas en las células del Sistema Inmune.

La regulación vagal se centra en el llamado “reflejo inflamatorio” que integra vías de regulación catecolaminérgicas que suponen un efecto antiinflamatorio gracias a la inhibición de la liberación de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α . Por ello, los fármacos que actúan a ese nivel tienen gran potencial antiinflamatorio y serán de especial importancia en enfermedades que desarrollan un componente inflamatorio como artritis reumatoide o enfermedad de Crohn. Las terapias no solo se centran en opciones farmacológicas, sino que se están estudiando modalidades no farmacológicas como la estimulación bioeléctrica del nervio vago.

En la regulación adrenérgica es necesario destacar la diferencia sobre la regulación innata y adaptativa. Con respecto a las terapias emergentes se están estudiando agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos con el fin de modular la respuesta inmune. En la práctica clínica esto supone un nuevo camino para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple e incluso para la terapia antineoplásica.

En estas dos vías de regulación se han desarrollado estudios, tanto preclínicos como clínicos, que ponen en evidencia la importancia terapéutica de los fármacos que actúan a estos niveles.

Palabras clave: sistema inmune, regulación nerviosa, nervio vago, citoquinas proinflamatorias, inflamación, TNF- α , reflejo antiinflamatorio, regulación adrenérgica, regulación colinérgica, artritis, enfermedad de Crohn, sepsis, estimulación bioeléctrica nervio vago.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El sistema inmune está regulado por el sistema nervioso mediante distintas vías. Para entender el funcionamiento, es importante conocer la organización del sistema nervioso.

El sistema nervioso está formado por el SNC (Sistema Nervioso Central) y SNP (Sistema Nervioso Periférico).

- El SNC comprende el cerebro y la médula espinal.
- El SNP está formado por nervios que, desde la médula espinal, se dirigen al resto del cuerpo. Se divide en sistema nervioso autónomo y sistema nervioso somático.
 - El sistema nervioso autónomo (SNA), a su vez consta de SNS (Sistema nervioso simpático), SNP (sistema nervioso parasimpático) y SNE (sistema nervioso entérico). Se ocupan de las funciones involuntarias. Las fibras postganglionares simpáticas liberan noradrenalina, adrenalina o dopamina y las fibras postganglionares parasimpáticas liberan acetilcolina.

- El sistema nervioso somático se encarga de los movimientos voluntarios mediante neuronas sensitivas y motoras.

2.1 Integración entre el sistema inmune y nervioso

Niels Kaj Jerne (1911-1944), un inmunólogo danés, fue uno de los primeros en postular las semejanzas entre el sistema nervioso y el sistema inmune. En uno de sus artículos sobre el sistema inmune, señaló: "Estos dos sistemas destacan entre todos los demás órganos de nuestro cuerpo por su capacidad para responder adecuadamente a una enorme variedad de señales".

La integración entre ambos sistemas se basa en la cooperación entre las células del sistema nervioso y las del sistema inmune. Esto implica que la liberación de citoquinas por parte de las células del sistema inmune está regulada por diferentes rutas neuronales. Este hecho se ha puesto de manifiesto recientemente porque se ha visto cómo las neuronas sensitivas expresan moléculas, por ejemplo, receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, como por ejemplo TLR4) y receptores para TNF- α , IL-1 y otras citoquinas, que en el pasado solo se relacionaban con la regulación inmune. Además, se han identificado en células inmunes receptores implicados en la regulación nerviosa del SNC y SNP. Son receptores de acetilcolina nicotínicos y muscarínicos, receptores alfa y beta adrenérgicos que se expresan en monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B ¹. Asimismo, las células inmunes son capaces de sintetizar acetilcolina, catecolaminas y otras moléculas que originalmente se identificaron como neurotransmisores y neuromoduladores ². Todo ello es de vital importancia debido a que la presencia de moléculas que detectan fragmentos de patógenos e inflamación en ambos tipos de células, inmunes y neuronas, permite que ambos sistemas trabajen de una forma coordinada y se potencie la respuesta frente a un daño.

La interacción entre ambos sistemas se representa en la figura 1. Las neuronas sensitivas o aferentes se activan directamente por patógenos (mediante receptores de reconocimiento de patrones) o por citoquinas. Hay dos tipos de neuronas sensitivas: las neuronas sensitivas que tienen sus cuerpos neuronales en el ganglio de la raíz dorsal (DRG) y las neuronas vagales aferentes que tienen sus cuerpos neuronales en el ganglio nodoso y yugular. Tras la activación envían la información hacia el SNC. En el SNC se integran las señales y se emite la información vía descendente a través de las fibras motoras o eferentes. Las fibras eferentes pueden ser simpáticas o vagales, con la liberación de catecolaminas y acetilcolina, respectivamente. Estos neurotransmisores interactúan con los receptores de las células inmunes permitiendo el control de la respuesta inmune.

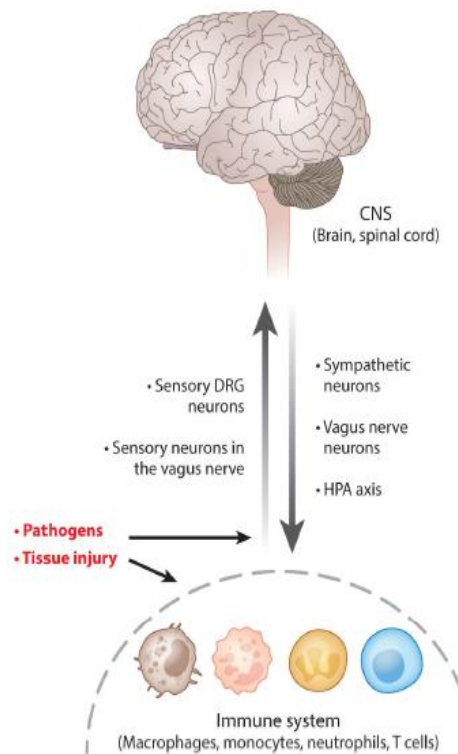


FIGURA 1. COMUNICACIÓN ENTRE EL SISTEMA INMUNE Y EL SISTEMA NERVIOSO. OBTENIDA DE PAVLOV ET AL (2018). (2)

Las fibras simpáticas y vagales están siendo cada vez más estudiadas en relación con la regulación inmune, existiendo evidencia científica sobre una regulación de la inmunidad mediante un reflejo neural.

2.2. Vías de regulación del sistema inmune

Hay tres vías de regulación nerviosa del sistema inmune (Figura 1):

- Vía colinérgica antiinflamatoria (CAIP): regulación vagal.
- Eje HPA: regulación vagal y adrenérgica.
- Vías adrenérgicas: regulación adrenérgica.

2.2.1 Vía colinérgica antiinflamatoria (CAIP)

Dentro del SNP, el **nervio vago** es el nervio más importante en relación con la regulación del sistema inmune. Además de la respuesta inmune controla otras funciones como el comportamiento, la digestión y la frecuencia cardiaca. Es el décimo nervio de los doce pares craneales. Es el nervio más largo del cuerpo humano, establece conexión entre el cerebro y el tracto gastrointestinal. Contiene aproximadamente el 80% de las fibras aferentes (sensitivas, transmiten información de la periferia al SNC) y el 20% de fibras eferentes (motoras, se proyectan a las vísceras).

Las fibras vagales aferentes y eferentes forman lo que se conoce como reflejo inflamatorio (*"The inflammatory reflex"*), que controla la respuesta de la inmunidad innata y la inflamación durante una infección por patógenos o un daño de un tejido. En este reflejo inflamatorio las fibras aferentes vagales, que son activadas por citoquinas o productos derivados de patógenos, envían señales al SNC, donde están integradas funcionalmente con las fibras eferentes vagales, las cuales regularán la inflamación mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias. El mecanismo por el que esto ocurre se explica detalladamente a continuación.

Las fibras sensoriales vagales son neuronas somatosensoriales (presentan los axones en la piel, articulaciones y músculo) y viscerales (inervan el tracto gastrointestinal, hígado, páncreas, pulmones, corazón y otros órganos). Ambas fibras se activan por patógenos o moléculas liberadas por las células inmunes. Esa activación es posible gracias a que presentan receptores para citoquinas (TNF- α , IL-6, IL-17, IL-1beta, IL-8), prostaglandinas y otras moléculas liberadas por macrófagos, neutrófilos o mastocitos y para productos liberados por bacterias, como LPS (lipopolisacárido). Estos receptores son de varios tipos: canales iónicos, GPCR (receptores acoplados a proteínas G), canales de calcio, receptores de reconocimiento de patrones (PRRs).

Una vez esas neuronas se activan, conectan con interneuronas en la médula espinal emitiendo la información hacia los ganglios yugular (superior) y nodoso (inferior) donde se encuentran sus cuerpos neuronales. Desde ellos la información se dirige al núcleo del tracto solitario (NTS) localizado en el bulbo raquídeo.

Las señales de las fibras sensoriales se integran en el SNC y la información viaja vía descendente mediante fibras eferentes vagales (neuronas motoras) que liberan acetilcolina en células del sistema inmune que se encuentran en los órganos del sistema reticuloendotelial como el bazo, hígado y tracto gastrointestinal. Los cuerpos neuronales de las fibras eferentes vagales residen en el núcleo motor dorsal del vago (DMN) y en el bulbo raquídeo (o médula oblonga) ³. La acetilcolina liberada por las fibras eferentes se une a los receptores nicotínicos alfa 7 ($\alpha 7nAChR$). La subunidad alfa 7 del receptor se expresa en macrófagos activados, monocitos, células dendríticas, linfocitos T y células endoteliales. Esa unión de la acetilcolina a sus receptores supone la activación de una cascada intracelular que inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α o IL-1 β .

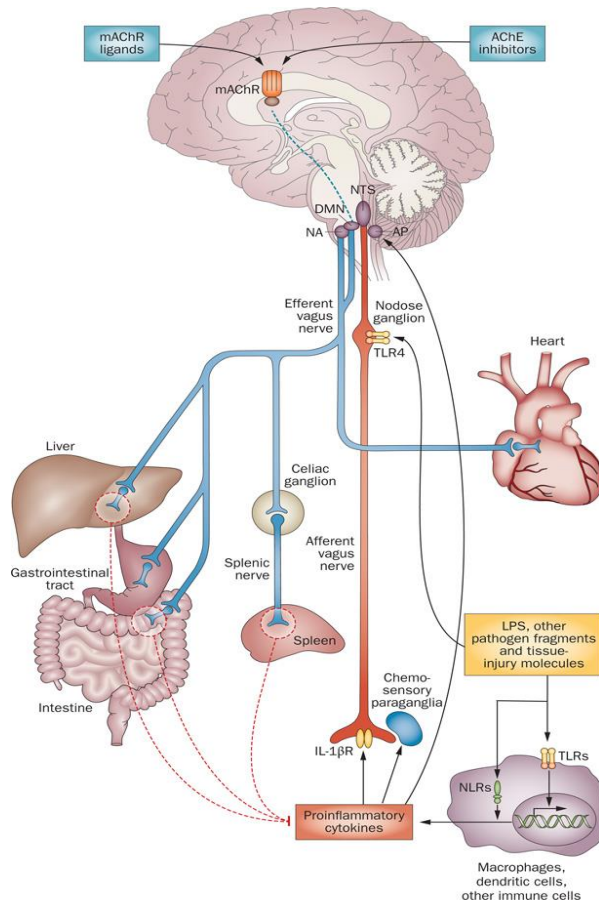


FIGURA 2. VÍA COLINÉRGICA ANTIINFLAMATORIA. OBTENIDO DE PAVLOV ETA AL. 2012. (3)

Las vías intracelulares que se activan son (Figura 6):

- Inhibición de la translocación nuclear de NF- κ - β
- Activación de la vía JAK-STAT con la consecuente fosforilación del factor STAT3

El hecho de que se inhiba la liberación de citoquinas proinflamatorias lleva a la denominación del brazo eferente del nervio vago como la **vía colinérgica antiinflamatoria (CAIP, *colinergic antiinflammatory pathway*)**.

La activación de las fibras eferentes vagales también puede ser regulada por el SNC mediante receptores muscarínicos de acetilcolina en el cerebro (Figura 2). La galantamina, que es un inhibidor de la acetilcolinesterasa en el cerebro, activa el brazo eferente vagal del reflejo inflamatorio por un mecanismo dependiente del receptor muscarínico cerebral ⁴. También actúan de igual forma los agonistas de los receptores M1 colinérgicos.

En la inervación del nervio vago con el tracto gastrointestinal y el bazo hay que tener en cuenta dos aspectos importantes:

a) La interacción del nervio vago con los macrófagos residentes en el intestino es indirecta, por medio de las neuronas entéricas, las cuales presentan su inervación cerca de los macrófagos residentes (Figura 3). Es decir, las fibras eferentes vagales sinaptan con neuronas entéricas (neuronas del SNA que controlan directamente el aparato digestivo mediante diversos plexos). Esas neuronas entéricas liberan acetilcolina, la cual se une al $\alpha 7nAChR$ de los macrófagos inhibiendo la liberación de TNF- α .

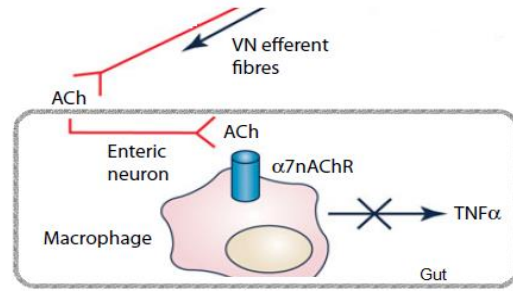


FIGURA 3. INERVACIÓN DEL NERVI VAGO EN EL INTESTINO. MODIFICADA DE BONAZ, B., ET AL (2016). (12)

b) Existe evidencia experimental de una cooperación entre las fibras eferentes vagales y el nervio esplénico. Las fibras vagales que se originan en el DMN inervan el ganglio celíaco, el cual permite la conexión entre las fibras eferentes vagales y el nervio esplénico. Las terminaciones nerviosas del nervio esplénico liberan catecolaminas (noradrenalina) en el bazo. Esas terminaciones están cerca de linfocitos T que expresan receptores beta 2 adrenérgicos ($\beta 2$ -AR) a los cuales se unen las catecolaminas. Una vez la noradrenalina se une a los receptores $\beta 2$ -AR se activa una enzima presente en esos linfocitos, denominada colina-acetiltransferasa (ChAT), responsable de la síntesis de acetilcolina (Figura 4).

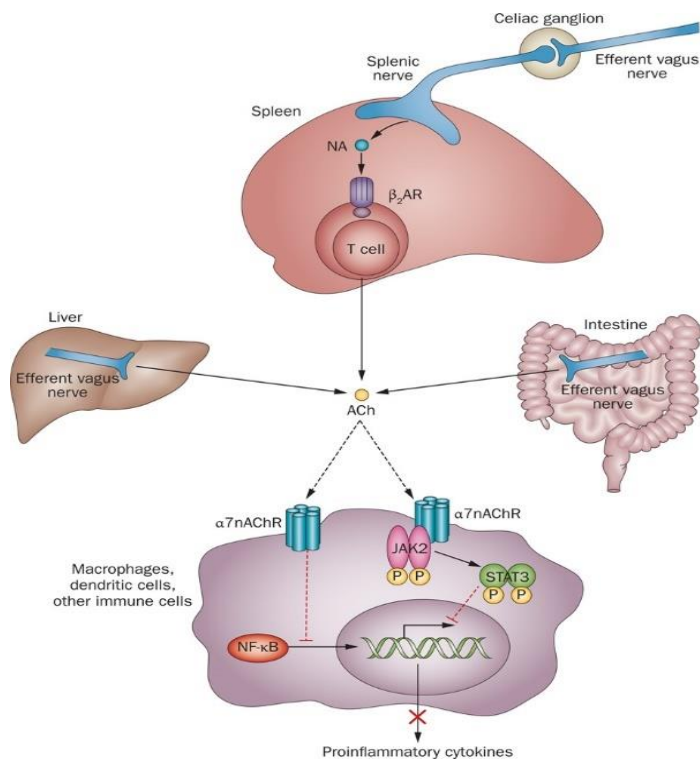


FIGURA 4. COOPERACIÓN NERVI VAGAL-ESPLÉNICO. INTERACCIÓN DE ACETILCOLINA CON SUS RECEPTORES. OBTENIDA DE PAVLOV, ET AL (2012) (3)

Con lo cual, la unión de las catecolaminas implica la liberación de acetilcolina por parte de los linfocitos T. Esta acetilcolina se une rápidamente a los receptores $\alpha 7nAChR$ expresados en macrófagos y otras células inmunes inhibiéndose la liberación de TNF- α y otras citoquinas proinflamatorias (IL-1 beta, IL-6, IL-8) de forma dosis-dependientes, pero no se inhibe la liberación de IL-10 (citoquina antiinflamatoria).

Antecedentes y desarrollo de los primeros fármacos:

El descubrimiento de moléculas que actuaban a nivel del reflejo vagal supuso un nuevo campo de investigación a partir del cual se ha conseguido conocer algunos de los mecanismos por los que el nervio vago regula la respuesta inmune.

La hipótesis de que la inflamación está bajo el control vagal mediante la inhibición de la liberación de citoquinas proinflamatorias se puso de manifiesto mediante diferentes estudios experimentales y ensayos clínicos en los cuales se estudió una molécula, Semapimod, conocida como CNI-1493, con propiedades antiinflamatorias. Esta molécula es una guanilhidrazona sintética que inhibe selectivamente la liberación de TNF- α y NO por macrófagos⁵. El mecanismo de acción se basa en que inhibe la fosforilación de p38 MAPK que interviene en la transcripción del RNAm de citoquinas proinflamatorias. Se han realizado ensayos clínicos con esta molécula como posible tratamiento alternativo a los anticuerpos anti-TNF alfa en la enfermedad de Crohn con resultados satisfactorios. Son estudios de fase II frente a placebo que están terminados, no estando comercializada la molécula (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00740103). Se postula como mejor alternativa que los anti-TNF alfa porque el Semapimod inhibe la liberación de otras citoquinas proinflamatorias y no solo TNF- α . Además, al contrario que los anticuerpos, no produce hipersensibilidad.

El estudio de esta molécula permitió establecer una relación entre el nervio vago y la regulación periférica del sistema inmune. Esto se descubrió cuando se inyectó CNI-1493 directamente en el cerebro de ratas y ratones en los que se había inducido una endotoxemia. Los resultados esperados eran que esa molécula bloqueara la producción de TNF- α y otras citoquinas en el cerebro, pero contra todo pronóstico se vio como la producción de citoquinas se inhibía también a nivel periférico en corazón, riñón, hígado y otros órganos. El punto clave es que esto solo ocurría en ratas con el nervio vagal intacto. Que el nervio vagal esté sin ningún daño es imprescindible en esta vía de regulación. De hecho, se ha visto como en ratas vagotomizadas, una estimulación eléctrica del nervio vago no se corresponde con un mecanismo antiinflamatorio⁶. Todo ello llevó a plantear el posible potencial terapéutico de la estimulación bioeléctrica del nervio vago^{7,8}.

Estudios recientes han puesto de manifiesto la importancia del papel del nervio vago en la transmisión de la información, desde la periferia hasta el SNC, tras una alteración inmune periférica:

- La administración intraperitoneal de TNF- α e IL-1 β en ratones, supuso incremento de la actividad vagal. Los ratones que carecen genéticamente de los receptores para TNF- α e IL-1 β no experimentan ese efecto.
- En los ratones en los cuales se corta transversalmente el nervio vago y se induce una sepsis experimental, se ve cómo no hay incremento de actividad vagal. Esto pone en evidencia la asociación entre las fibras aferentes y las eferentes.

Receptor nicotínico alfa 7 ($\alpha 7nAChR$)⁹:

En el estudio del “reflejo inflamatorio” es esencial la función del receptor nicotínico alfa 7. Está formado por 5 subunidades $\alpha 7$ iguales que forman un poro central con permeabilidad al calcio. Hay clara evidencia de que este receptor se expresa en macrófagos, monocitos y células dendríticas. Por ello, el uso de agonistas y antagonistas afectará a la función de esas células. Este receptor también se expresa en neutrófilos, linfocitos B y T, pero éstos también tienen otros tipos de receptores nicotínicos y muscarínicos. Los fármacos que actúen sobre ese receptor modificarán la función de esas células.

Es importante sobre todo el papel de los macrófagos en la respuesta celular innata. Hay dos poblaciones de macrófagos que pueden interconvertirse: M1 (proinflamatorios) y M2 (antiinflamatorios). Los M2 son los que contribuyen al control de la infección, pero sobre los M1 se centran la terapia colinérgica antiinflamatoria. Los macrófagos se activan al fenotipo M1 cuando son activados por ligandos como LPS (lipopolisacárido, componente de las membranas bacterianas), que se une a su receptor TLR4, presente en los macrófagos. La activación del macrófago supone la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, TNF- α , IL-1 β , HMGB1, lo cual supone la activación de la respuesta inmune innata. Por el contrario, la unión de agonistas a los $\alpha 7nAChR$ de los macrófagos inhibirá la liberación de esas citoquinas.

2.2.2 Eje HPA (hipófisis-pituitaria-adrenal)

Este eje es estimulado por fibras vagales aferentes que, a su vez, son activadas por citoquinas proinflamatorias liberadas en la periferia en situaciones de inflamación (Figura 5). En concreto, las fibras aferentes vagales, tienen receptores para IL-1 β a nivel del paraganglio, desde donde se dirige la información al NTS, donde las neuronas locales noradrenérgicas son activadas y proyectan la información hacia la zona parvo-celular, con la consecuente activación del CRF (factor liberador de corticotropina), secretándose la hormona adrenocorticotropina (ACTH). La ACTH induce la síntesis y liberación de glucocorticoides por las glándulas adrenales consiguiendo una disminución de la inflamación periférica ¹⁰.

Por tanto, el nervio vago tiene un papel antiinflamatorio, ya que activa el eje HPA a través de sus fibras aferentes.

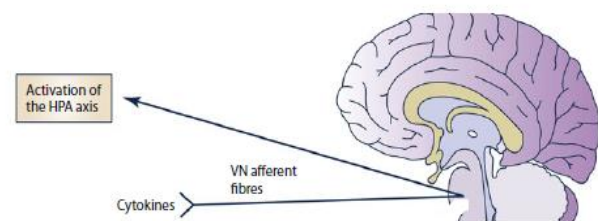


FIGURA 5. EJE HPA. OBTENIDO DE BONAZ, B. ET AL (2016) (12)

2.2.3 Regulación adrenérgica

Además de las fibras vagales, las fibras simpáticas también son importantes pues existe una regulación adrenérgica de las funciones inmunes.

La activación del SNS y la consecuente liberación de catecolaminas ocurre tras un estímulo estresante o ejercicio. Esas catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) se liberan desde las fibras postganglionares simpáticas y desde la médula adrenal e inervan órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) y secundarios (bazo y ganglios linfáticos) ¹¹. Desde esos órganos difunden a la sangre y así llegan hasta las células, donde se unen a sus receptores. Los receptores de las catecolaminas pueden ser alfa adrenérgicos o beta adrenérgicos y se expresan en diferentes tipos celulares. El receptor $\beta 2$ adrenérgico ($\beta 2$ -AR) es el que se expresa en mayor medida en las células inmunes, por ello es el más estudiado. De esa forma, las catecolaminas, son capaces de regular la respuesta inmune innata y adaptativa.

a) Respuesta innata ¹¹: el sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa ante microorganismos. Sin embargo, está aumentando su papel en enfermedades no infecciosas, como esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y otras enfermedades neurodegenerativas.

Las células de la respuesta inmune innata son: neutrófilos, monocitos, macrófagos, células T, células NK (Natural Killer) y células dendríticas (DC). Todas estas células expresan receptores β 2-AR. El mecanismo de acción está relacionado con efectos antiinflamatorios y es un mecanismo receptor-dependiente.

En cada una de esas células, la unión de las catecolaminas a esos receptores tiene diferentes efectos:

- En las células NK, la activación de los receptores β 2-AR supone una disminución de su actividad. Es decir, situaciones de estrés o administración de agonistas adrenérgicos suponen una disminución de la citotoxicidad.
- En monocitos y macrófagos, la activación de los β 2-AR suele ser antiinflamatoria. La unión de las catecolaminas a los receptores desencadena una cascada de señalización (Figura 6). Comienza con la activación de AMPc y de la proteína kinasa A (PKA), llevando a la supresión del factor nuclear NF- κ -beta e inhibición de la producción de TNF- α y otras citoquinas proinflamatorias. Además, la señalización a través de estos receptores también regula la producción de moléculas antiinflamatorias como IL-10 y TFG- β .
- En células dendríticas, los β 2-AR median la diferenciación de los linfocitos Th en Th1/Th2.
- En microglía y astrocitos, una mala regulación de los β 2-AR puede suponer una neuroinflamación en enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas.
- En neutrófilos: adrenalina y noradrenalina inhiben su migración, la expresión de CD11b/CD18 (molécula de adhesión propia de monocitos y neutrófilos) y el metabolismo oxidativo mediante esos receptores.

b) Regulación de la respuesta adaptativa ¹²: las catecolaminas regulan la inmunidad adaptativa mediante la diferenciación de los linfocitos T en Th1 y Th2. También es importante el efecto sobre los linfocitos Th17.

Los Th17 expresan receptores β 2-AR. Los agonistas de este receptor aumentan los niveles de IL-17A (citoquina proinflamatoria) y reducen los de INF- γ (antiinflamatorio). Es decir, IL-17A e INF- γ se regulan de modo recíproco. Además, las células Th17 contribuyen a enfermedades autoinmunes inflamatorias como esclerosis múltiple, psoriasis y artritis reumatoide.

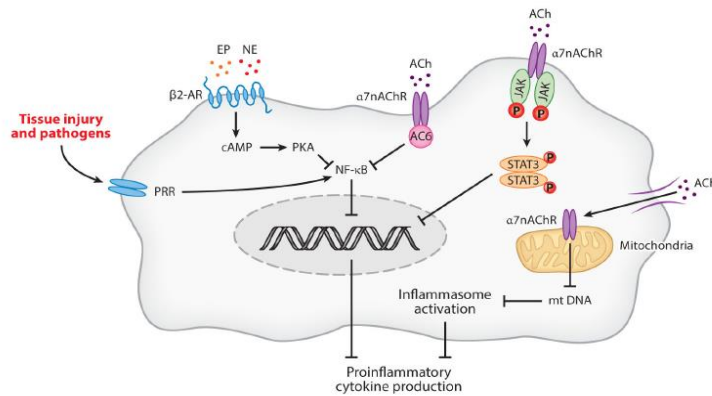


FIGURA 6. VÍAS INTRACELULARES ADRENÉRGICAS Y COLINÉRGICAS. OBTENIDA DE PAVLOV, V. A. ET AL (2018) (2)

3. OBJETIVOS

La inflamación es responsable de muchas enfermedades crónicas como Enfermedad inflamatoria intestinal o IBD (*Inflammatory Bowel disease*), artritis reumatoide y otras. Se deberá comprobar mediante estudios experimentales en animales y ensayos clínicos si las citoquinas proinflamatorias pueden, por sí mismas, ser responsables del desarrollo de los síntomas de estas enfermedades. Por tanto, se tratará de estudiar las posibles actuaciones farmacológicas en las vías implicadas en la liberación de esas citoquinas.

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de estrategias de intervención en las distintas rutas, para disminuir la liberación de citoquinas, y como consecuencia disminuir la inflamación en enfermedades inflamatorias locales (artritis reumatoide) o sistémicas (sepsis).

- a) Revisión de las posibles aplicaciones terapéuticas en el reflejo antiinflamatorio: intervenciones farmacológicas y no farmacológicas.
- b) Estudiar el efecto de la inflamación en el sistema nervioso central.
- c) Comprender las bases de la regulación adrenérgica y las terapias potenciales en ella.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una revisión bibliográfica utilizando bases de datos como PubMed. Las búsquedas se hacen filtrando por MeSH, por ejemplo, “vagus nerve”, “adrenergic regulation” “inflammatory reflex” “vagus nerve stimulation” “adrenergic regulation”. También se ha consultado la página web clinicaltrials.gov a través de NIH, donde están publicados todos los ensayos clínicos, tanto públicos como privados, completos o que se están realizando actualmente y en todo el mundo.

Se han consultado publicaciones recientes con el fin de obtener la información más actualizada posible.

5. RESULTADOS

a) Opciones terapéuticas a nivel del reflejo antiinflamatorio

El descubrimiento de la ruta vagal antiinflamatoria ha supuesto un nuevo campo de investigación, en la búsqueda de moléculas y mecanismos que contribuyan a la respuesta antiinflamatoria, para poder trasladarlo a enfermedades con un componente inflamatorio. El éxito en algunos de los ensayos preclínicos ha llevado al desarrollo de ensayos clínicos, en los que, actualmente, se están llevando a cabo investigaciones para evaluar la eficacia y seguridad de esas terapias antiinflamatorias en humanos. Las opciones terapéuticas evaluadas consisten en la estimulación bioeléctrica y la terapia farmacológica.

Estimulación bioeléctrica del nervio vago (VNS): se estudia como un posible tratamiento no farmacológico. Es importante para algunas enfermedades inflamatorias relacionadas con la liberación de TNF- α , como son la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal. Se están desarrollando ensayos clínicos para evaluar la efectividad de esta terapia en la inflamación crónica. En estudios experimentales se ha visto cómo la estimulación eléctrica directa del nervio vago puede inhibir la liberación de TNF- α en hígado, bazo o corazón.

La estimulación crónica del nervio vago se ha usado desde hace, aproximadamente, dos décadas y está actualmente aprobada para el tratamiento refractario de epilepsia y depresión crónica resistente a otras terapias. En esas condiciones muestra evidencias de eficacia y seguridad, con lo cual no es extraño que se esté evaluando su uso en ensayos clínicos para enfermedades inflamatorias crónicas como IBD o artritis reumatoide⁹. Para la realización de esta técnica existen protocolos, en los que se requiere cirugía para implantar el generador de pulsos. Por este motivo su uso se ve limitado en inflamación crónica.

La estimulación del nervio vago es una técnica invasiva, por lo que también se están investigando otras opciones en ensayos clínicos. Estas nuevas alternativas pasan por hacer una estimulación del nervio vago con electrodos transvenosos o transcutáneos. Otra posibilidad se basa en colocar un electrodo en el oído externo. Sin embargo, estas técnicas aún están siendo evaluadas.

La estimulación bioeléctrica del nervio vago se experimentó en modelos animales y tras los resultados satisfactorios se pasó al estudio en personas. Los ensayos clínicos se han realizado en pacientes con enfermedades con componente inflamatorio como enfermedad de Crohn o artritis.

- En pacientes con enfermedad de Crohn se han realizado ensayos clínicos con resultados positivos. Uno de esos estudios (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01569503) que finalizó en marzo de 2017 tenía como objetivo el desarrollo de la nueva terapia bioeléctrica como alternativa a la terapia anti-TNF α . Con la estimulación vagal se pretende conseguir una mayor adherencia que con los fármacos anti-TNF. La terapia VNS consiste en el implante de un dispositivo que manda señales intermitentes al nervio vago del paciente. Se trata de un dispositivo del tamaño de un marcapasos que se implanta en la zona izquierda del pecho justo debajo de la clavícula. El dispositivo envía

una señal eléctrica a través de un cable a los electrodos que se colocan en la zona del cuello, zona en la que se encuentran numerosas fibras vagales. Las fibras vagales eferentes que transcurren por el cuello inervan el tracto gastrointestinal, liberando acetilcolina, la cual ejerce los efectos antiinflamatorios gracias a que inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos residentes en el tracto gastrointestinal. Los resultados pusieron de manifiesto la remisión clínica de la enfermedad.

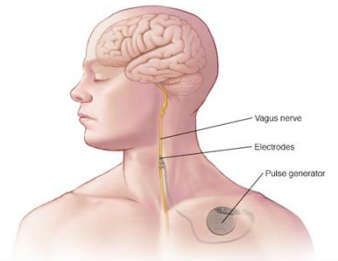


FIGURA 8. OBTENIDA DE MAYO CLINIC.

En otro estudio piloto se incluyeron siete pacientes con enfermedad de Crohn activa ¹³. Dos de ellos salieron del estudio por complicaciones, mientras que los 5 restantes evolucionaron favorablemente con remisión clínica, biológica y endoscópica.

- En el caso de la artritis reumatoide y su relación con la estimulación vagal, cobran especial interés trabajos recientes que han puesto de manifiesto cómo la reducción de la función vagal precede al desarrollo de artritis reumatoide, en pacientes con riesgo de padecerla ¹⁴. Por otra parte, en un estudio realizado se ha demostrado cómo la estimulación bioeléctrica del nervio vago durante 1-4 minutos supone una mejora de los síntomas en pacientes con artritis, tanto en estadio temprano como avanzado.

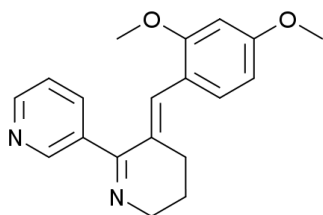
Actualmente hay otro estudio guiado por Set Point Medical para evaluar la eficacia y efectividad de la estimulación vagal en pacientes con enfermedad de Crohn observándose una mejoría en varios de ellos. También Set Point Medical ha llevado a cabo otro ensayo clínico en Europa usando la estimulación vagal en personas con artritis reumatoide con resultados exitosos.

Activación farmacológica de la vía colinérgica antiinflamatoria: Hay varias formas de activar la vía colinérgica antiinflamatoria mediante mecanismos farmacológicos. La forma más directa de hacerlo es mediante agonistas del receptor alfa 7 nicotínico, o moduladores alostéricos, que activarán los receptores nicotínicos alfa 7 de macrófagos y otras células inmunes.

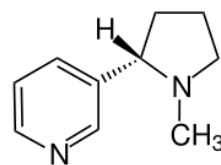
Los fármacos que actúan a nivel del $\alpha 7nAChR$ se dividen en (Tabla 1):

- Agonistas no selectivos del receptor: acetilcolina y nicotina. Son no selectivos porque actúan sobre todos los tipos de receptores, incluyendo los alfa 7 nicotínicos. No son de aplicación farmacológica debido a las reacciones adversas que supondría la activación del resto de receptores nicotínicos.
- Agonistas selectivos del receptor: colina. La colina es un metabolito de la acetilcolina. Se usa como agonista selectivo en experimentos in vitro e in vivo. Los agonistas selectivos, además de actuar sólo sobre el $\alpha 7nAChR$ y no sobre otros, tienen la capacidad de estimular neuronas simpáticas del reflejo antiinflamatorio, con lo cual se incrementa la estimulación noradrenérgica en las células T colinérgicas en el bazo.

- Agonistas parciales: GTS-21. Es un derivado de la anabasina, alcaloide de la piridina, químicamente similar a la nicotina.



GTS-21 3-(2,4-DIMETHOXY-BENZYLIDENE) ANABASINA



NICOTINA

- Antagonistas del receptor: alfa-bungarotoxina (toxina procedente de serpientes) y Methyllycaconitine (alcaloide)¹⁵.
- Moduladores alostéricos positivos: el sitio de unión alostérico es diferente al sitio de unión de los agonistas. La unión de los moduladores alostéricos no supone una respuesta, pero sí facilita la respuesta de los agonistas como acetilcolina y nicotina. Es decir, incrementan el efecto de los agonistas de forma concentración-dependiente. Los moduladores alostéricos se clasifican en tipo I y tipo II en función del incremento de respuesta que producen en los agonistas. Los de tipo II son los que presentan potencial terapéutico por su mayor selectividad. PNU-120596 es un modulador tipo II usado en estudios de inflamación¹⁶.

TIPO DE FÁRMACO	FÁRMACO
Agonista no selectivo	- Acetilcolina - Nicotina
Agonista selectivo $\alpha 7$	- Colina - AR-R1779
Agonista parcial $\alpha 7$	- GTS-21
Antagonista selectivo $\alpha 7$	- Alfa bungarotoxina (α -BTX) - Methyllycaconitine (MLA)
Moduladores alostéricos positivos	
- Tipo I	- Galantamina, ivermectina
- Tipo II	- PNU-120596

TABLA 1. FÁRMACOS QUE ACTÚAN SOBRE EL RECEPTOR ALFA-7-NICOTÍNICO. OBTENIDA DE HOOVER D. B. (2017) (13)

Diversos estudios han demostrado que los agonistas nicotínicos producen una inhibición concentración-dependiente de la síntesis y liberación de mediadores proinflamatorios, por ejemplo, IL-1 β , TNF- α , IL-6, pero no afectan a citoquinas antiinflamatorias como IL-10 ^{¡Error! Marcador no definido.}. Este efecto es nulo en ratones alfa-7 “knock-out” o en células que han sido modificadas en su RNA para reducir los niveles de dicho receptor.

Los resultados del uso de los agonistas nicotínicos se han estudiado experimentalmente en endotoxemia en ratas, sepsis, inflamación cerebral, isquemia, daño tisular y otras condiciones de inflamación:

- Endotoxemia y sepsis: En muchos de los estudios se crean modelos experimentales de endotoxemia en animales mediante la administración intraperitoneal de LPS (lipopolisacárido). En dichos estudios se ha visto cómo la administración de nicotina, 30 minutos antes de la inyección de una dosis letal de LPS, causa un incremento dosis-dependiente de la supervivencia.^{Error! Marcador no definido.}
- Sepsis¹⁷: En un estudio preclínico en el que se induce una peritonitis séptica en ratones, mediante la inyección intraperitoneal de *E. coli* vivo, los resultados observados fueron:
 - o Si, previamente a la inducción séptica, se realiza una vagotomía, la sepsis aumenta, se produce un incremento de neutrófilos y de citoquinas proinflamatorias, así como de daño hepático.
 - o Si se hace un tratamiento con nicotina, la sepsis disminuye, independientemente de la integridad del nervio vago, porque se está actuando, directamente, en los receptores nicotínicos presentes en los macrófagos.
- Daño tisular por quemadura: al igual que con la estimulación del nervio vago, se ve cómo la administración transdérmica de nicotina en ratas, tras una quemadura, disminuye o inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, normaliza la presión sanguínea y mejora la función contráctil cardíaca ⁹.
- Artritis reumatoide: los modelos experimentales de artritis en ratas se pueden generar por la inyección de colágeno. En estos estudios se ha evaluado la respuesta a nicotina y a un agonista selectivo del receptor alfa 7 (AR-R1779). Los resultados mostraron que las dos moléculas reducían las manifestaciones clínicas de la artritis, la inflamación articular y disminuían los niveles de TNF- α e IL-6.
- IBD: La IBD induce colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, estudiándose las intervenciones farmacológicas en ambas enfermedades. La experiencia clínica demuestra que fumar tiene efectos beneficiosos en pacientes con colitis, lo cual se puede atribuir a la nicotina del tabaco. Por otra parte, la exacerbación de la colitis, tras una vagotomía, se revirtió gracias al tratamiento con nicotina. Además, el tratamiento de ratas normales con colina disminuyó la gravedad de la colitis. Sin embargo, el uso de nicotina en terapéutica no sería viable porque no es selectivo para los receptores alfa 7 teniendo consecuencias adversas por activación de otros tipos de receptores nicotínicos.

Los estudios clínicos publicados, realizados con drogas que activan la vía colinérgica antiinflamatoria, se reducen básicamente a la evaluación de los efectos de GTS-21 ante la administración de LPS en voluntarios sanos y no fumadores. Se vio una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de GTS-21 y de citoquinas proinflamatorias⁹. En un ensayo clínico (Clinical Trial Register No. NCT00783068) se evaluaron las propiedades antiinflamatorias de GTS-21 en la respuesta innata durante una situación experimental de endotoxemia en humanos. La endotoxemia se induce mediante la administración de LPS, lo cual resulta en el incremento de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-6, IL-1). Tras la administración de GTS-21 se observa una disminución de estas citoquinas concentración-dependiente. Es decir, conforme

aumenta la concentración de GTS-21 disminuyen los niveles de esas citoquinas. Con lo cual, se demuestra como GTS-21 disminuye la inflamación inducida por LPS en humanos. Además, no se observaron efectos adversos destacables.

Otra de forma de activar la vía colinérgica antiinflamatoria consiste en el uso de agonistas centrales muscarínicos M1, galantamina u otros inhibidores de acetilcolinesterasa. Sin embargo, la eficacia de los inhibidores de la acetilcolinesterasa que actúan exclusivamente en la periferia no ha sido demostrada en ensayos clínicos.

b) Efecto de la inflamación en el SNC

El estudio relativo al impacto de la inflamación crónica periférica en la función cerebral aporta los siguientes resultados:

- Se ha visto cómo episodios de sepsis suponen una disfunción cerebral, en lo que se conoce como encefalopatía asociada a sepsis (SAE). Se trata de una disfunción cerebral secundaria de una infección y sin afectación del SNC. Esa disfunción lleva a una hipofunción colinérgica y niveles desequilibrados de dopamina y otros neurotransmisores, lo cual da lugar a cuadros de delirio, uno de los síntomas característicos de SAE ¹⁸.
- En relación con la inflamación sistémica y la liberación de IL-1 β y TNF- α , se ha comprobado cómo estas citoquinas son clave en la producción de neuroinflamación en el hipocampo en ratas ¹⁹.
- En algunas enfermedades autoinmunes, como por ejemplo lupus eritematoso, se producen anticuerpos que tienen la capacidad de acceder al SNC. Estos anticuerpos son anti-DNA/NMDAR y anti-P (antiproteína P ribosomal). Los anticuerpos anti-DNA/NMDAR tienen como diana el NMDA, receptor de glutamato, con lo cual afectan a la regulación glutamatérgica y como consecuencia se produce una disfunción cerebral.

Estos estudios muestran cómo inflamaciones graves pueden afectar a la función cerebral, pudiendo perder parte de la eficacia regulatoria de la función inmune, pero también del control cardiovascular y de la regulación de la homeostasis metabólica. Aunque se han desarrollado algunos estudios es necesario seguir investigando en este campo.

c) Intervención farmacológica en la regulación adrenérgica

La regulación adrenérgica del sistema inmune supone un campo de estudio con potencial aplicación terapéutica pues en ella se basan muchas enfermedades inflamatorias, como esclerosis múltiple, artritis reumatoide o cáncer ²⁰.

Con respecto al cáncer, se ha visto cómo la progresión del tumor, muchas veces, está mediada por la activación de receptores β 2 que disminuyen la actividad de las células NK y con lo cual disminuye la citotoxicidad ^{21, 22}. Sin embargo, algunos estudios ponen de manifiesto el papel de la noradrenalina y adrenalina, directamente, en la proliferación, angiogénesis, invasión, migración y metástasis.

Se han realizado algunos estudios epidemiológicos sobre el papel de los antagonistas $\beta 2$ adrenérgicos (beta bloqueantes) en melanoma²³ y cáncer de mama²⁴, pero se necesitan ensayos clínicos randomizados, que aporten más evidencia sobre el potencial de la manipulación de los receptores $\beta 2$ adrenérgicos como terapia antitumoral.

Recientemente se ha investigado el uso profiláctico de los beta bloqueantes, en asociación con inhibidores de la COX, para reducir la inmunosupresión postoperatoria y la metástasis mediante el incremento de la actividad de las células NK. En ensayos clínicos sobre beta bloqueantes en cáncer se aportó evidencia de que su uso podía estar relacionado con un aumento de la supervivencia, especialmente en pacientes en estadios tempranos y que han recibido cirugía. Existe un ensayo clínico (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00502684) en el que se estudia el efecto del propranolol en cáncer de mama tras la cirugía. Este ensayo se basa en que durante la cirugía el sistema inmune se deprime y eso favorece la metástasis. Con lo cual, con un beta bloqueante se conseguiría aumentar la actividad de las células NK y así disminuir la depresión del sistema inmune reduciendo el riesgo de metástasis. Para comprobar esta teoría se administró propranolol antes, durante y después de la cirugía. El problema que plantea este ensayo radica en que el propranolol es un beta bloqueante no selectivo, con lo cual puede provocar efectos adversos en personas con otras enfermedades de base.

6. DISCUSIÓN

Los estudios recientes de los mecanismos neuroinmunes han permitido descubrir rutas básicas neuronales, mediante las cuales se detectan condiciones adversas y se responde ante ellas a través de fibras vagales eferentes, de circuitos simpáticos y del eje HPA.

Los descubrimientos más importantes han sido:

- Identificación de la respuesta antiinflamatoria vagal y su consecuente aplicación farmacológica con la VNS.
- Integración de células T colinérgicas con las vías eferentes neuroinmunes.
- Identificación de los receptores alfa 7 nicotínicos en macrófagos, células dendríticas y otras células inmunes, que facilita el desarrollo de fármacos selectivos para ese receptor.
- Identificación de los mecanismos simpáticos que influyen en la regulación inmune.

Todos estos avances se han traducido en estudios con modelos animales y en ensayos clínicos que están en desarrollo.

El estudio continuado y la investigación farmacéutica en los receptores alfa 7 nicotínicos, incluyendo los moduladores alostéricos, puede abrir un gran camino hacia nuevas terapias para enfermedades inflamatorias. Además, se sabe que el tono vagal está implicado en enfermedades con un componente inflamatorio y que la normalización del tono vagal puede ser una estrategia terapéutica. Es importante sobre todo el desarrollo de ensayos clínicos randomizados con mayor número de pacientes, sobre todo para evaluar la efectividad y seguridad de la terapia VNS.

En cuanto a la regulación adrenérgica de las funciones inmunes, se han desarrollado algunos estudios. Sin embargo, actualmente, la mayoría de los fármacos simpaticomiméticos no se usan con indicaciones inmunomoduladores sino como agentes broncodilatadores o para el tratamiento de la hipertensión arterial. Por otra parte, es de especial importancia seguir estudiando las nuevas opciones terapéuticas planteadas con células NK en terapia antineoplásica.

Gracias a los nuevos conocimientos sobre la regulación nerviosa del sistema inmune, se están desarrollando nuevos tratamientos para las enfermedades inflamatorias humanas. Muchas de ellas son poco conocidas, pero condicionan el estilo de vida de las personas que las padecen. Por ello, es fundamental seguir investigando y conseguir nuevos avances, los cuales deben basarse en aportar la evidencia suficiente como para poder pasar de los estudios preclínicos a clínicos. Aunque los estudios clínicos pueden suponer un largo periodo de tiempo, al tratarse de inflamación crónica, se debe seguir con las líneas de investigación actuales para obtener nuevos tratamientos en un futuro.

7. CONCLUSIONES

- a) La vía de regulación nerviosa del sistema inmune que más aplicación terapéutica ofrece es el reflejo inflamatorio. Tanto las actuaciones no farmacológicas (estimulación bioeléctrica del nervio vago) como las farmacológicas (fármacos que actúan a nivel del receptor nicotínico alfa 7) son de gran relevancia terapéutica como se ha puesto de manifiesto en ensayos experimentales y clínicos.
- b) La inflamación periférica afecta a la función cerebral. Es importante el desarrollo de las nuevas estrategias en este aspecto pues si se daña la función cerebral también se ve comprometida la regulación del sistema inmune, por ser el cerebro el punto de integración de las señales.
- c) Con respecto a la regulación adrenérgica, los avances conseguidos hasta el momento, tanto en estudios experimentales como en ensayos clínicos, muestran cómo los fármacos que actúan a nivel de los receptores β_2 adrenérgicos son importantes en terapéutica. Se estudian los receptores β_2 adrenérgicos porque sobre los efectos inmunes de los receptores alfa aún no hay evidencias claras y se requiere más investigación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci.* 2012; 91 (21-22): 1027–1032.
- ² Pavlov, V. A., Chavan, S. S., Tracey, K. J. Molecular and functional neuroscience in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2018; 36: 783–812.
- ³ Pavlov, V. A., Tracey, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex-linking immunity and metabolism. *Nat Rev.* 2012; 8(12): 743–754.
- ⁴ Pavlov, V. A., Parrish, W. R., Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Puerta, M., Ochani, K., Chavan, S., Al-Abed, Y., Tracey, K. J. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun.* 2008; 23(1): 41-5.
- ⁵ Bianchi, M., Ulrich, P., Bloom, O., Meistrell, M., Zimmerman, G. A., Schmidtmayerova, H., Bukrinsky, M., Donnelley, T., Bucala, R., Sherry, B., et al. An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol Med.* 1995; 1: 254–26.
- ⁶ Bernik, T. R., Friedman, S. G., Ochani, M., Di Raimo, R., Ulloa, L., Yang, H., Sudan, S., Czura, C. J., Ivanova, S. M., Tracey, K. J. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med.* 2002; 195: 781–788.
- ⁷ Oke SL, Tracey KJ. From CNI-1493 to the immunological homunculus: physiology of the inflammatory reflex. *J Leukoc Biol.* 2008; 83:512–517.
- ⁸ Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nat.* 2000; 405 (6785):458-462.
- ⁹ Hoover D.B. Cholinergic Modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. *Pharmacol Ther.* 2017; 179: 1-16.
- ¹⁰ Bonaz, B., Sinniger, V., Pellissier, S. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J Physiol.* 2016; 594(20): 5781-5790.
- ¹¹ Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol.* 2015; 6:171.
- ¹² Catalina M. Carvajal Gonczi, Mahdieh Tabatabaei Shafiei, Ashley East, Erika Martire, Meagane H. I. Maurice-Ventouris, Peter J. Darlington. Reciprocal modulation of helper Th1 and Th17 cells by the b2-adrenergic receptor agonist drug terbutaline. *The FEBS Journal.* 2017; 284 (18): 3018-3028.
- ¹³ Bonaz B, Sinniger V, Hoffmann D, Clarencon D, Mathieu N. Chronic vagus nerve stimulation in Crohn's disease: a 6-month follow-up pilot study. *Neurogastroenterol Motil.* 2016; 28 (6): 948–953.
- ¹⁴ Frieda A. Koopman, Sangeeta S. Chavan, Sanda Miljko, Simeon Grazio, Sekib Sokolovic, P. Richard Schuurman, Ashesh D. Mehta, Yaakov A. Levine, Michael Faltys, Ralph Zitnik, Kevin J. Tracey, Paul P. Tak. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine

production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Jul 2016, 113 (29) 8284-8289

¹⁵ Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M., Rogers, S. W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 2009; 89(1), 73–120.

¹⁶ Peng, C., Kimbrell, M. R., Tian, C., Pack, T. F., Crooks, P. A., Fifer, E. K., Papke, R. L. Multiple modes of $\alpha 7$ nAChR noncompetitive antagonism of control agonist-evoked and allosterically enhanced currents. *Mol Pharmacol*. 2013; 84(3), 459–475.

¹⁷ Van Westerloo, D. J., Giebelen, I. A., Florquin, S., Daalhuisen, J., Bruno, M. J., de Vos, A. F., Tracey, K. J., van der Poll, T. The cholinergic antiinflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis*. 2005; 191 (12): 2138-2148.

¹⁸ Gofton TE, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8: 557-662.

¹⁹ Cibelli M, Fidalgo AR, Terrando N, Ma D, Monaco C. Role of interleukin-1 β in postoperative cognitive dysfunction. *Ann Neurol*. 2010; 68 (3):360-368.

²⁰ Marino F, Cosentino, M. Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids*. 2013; 45 (1): 55-71.

²¹ Rosenne, E., Shakhar, G., Melamed, R., Schwartz, Y., Erdreich-Epstein, A., Ben-Eliyahu, S. Inducing a mode of NK-resistance to suppression by stress and surgery: a potential approach based on low dose of poly I-C to reduce postoperative cancer metastasis. *Brain Behav Immun*. 2006; 21(4), 395–408.

²² Whalen MM, Bankhurst AD. Effects of beta-adrenergic receptor activation, cholera toxin and forskolin on human natural killer cell function. *Biochem J*. 1990; 272(2):327–331.

²³ De Giorgi V1, Grazzini M, Gandini S, Benemei S, Lotti T, Marchionni N, Geppetti. P. Treatment with β -blockers and reduced disease progression in patients with thick melanoma. *Arch Intern Med*. 2011; 171(8):779-781.

²⁴ Barron, T. I., Sharp, L., Visvanathan, K. Beta-adrenergic blocking drugs in breast cancer: a perspective review. *Ther Adv Med Oncol*. 2012; 4(3): 113-125.