

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 347**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 33/00** (2006.01)

**A61K 31/08** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2005 PCT/GB2005/003253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2006 WO06018655**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2005 E 05775402 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 1778256**

54 Título: **Utilización de xenón como neuroprotector en un sujeto neonatal**

30 Prioridad:

**19.08.2004 GB 0418540**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.06.2018**

73 Titular/es:

**IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (100.0%)  
52 Princes Gate, Exhibition Road  
London SW7 2PG, GB**

72 Inventor/es:

**FRANKS, NICHOLAS y  
MAZE, MERVYN**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 674 347 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Utilización de xenón como neuroprotector en un sujeto neonatal.

5 La presente invención se refiere al campo de los anestésicos. Más específicamente, la invención se refiere a agentes anestésicos adecuados para su utilización en sujetos recién nacidos y/o fetales.

**Antecedentes de la invención**

10 Durante más de 50 años, se han conocido las propiedades anestésicas del xenón en la profesión médica (Cullen y Gross, 1951). Sin embargo, a pesar de algunas presentaciones impresionantes de eficacia clínica en pacientes (Luttropp *et al.*, 1994; Lynch *et al.*, 2000), la utilización diaria de xenón no ha logrado materializarse. Esto está asociado en gran medida con el coste significativo que implica la producción de xenón a través de destilación fraccionada de aire líquido, y por tanto el porcentaje relativamente pequeño de la cantidad refinada total de xenón disponible para anestesia (Harms Marx *et al.*, 2001). En consecuencia, es probable que la utilización de xenón esté restringida a áreas especiales en donde hay una ventaja apreciable de coste-beneficio. Un área de este tipo puede ser la anestesia neonatal, en donde el xenón puede carecer de efectos secundarios perjudiciales observados con otros anestésicos neonatales comúnmente utilizados, por ejemplo óxido nitroso (Layzer, 1978; Amos *et al.*, 1982; Jevtovic-Todorovic *et al.*, 1998).

20 Está bien documentado en la técnica que los ataques neonatales provocan efectos duraderos (Anand y Scalzo, 2000; Balduini *et al.*, 2000; Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2003). Por tanto, es razonable adoptar un grado de precaución cuando se utilizan fármacos en el neonato que podrían alterar potencialmente el desarrollo neuronal (tales como alcohol, fenciclidina, ketamina, N<sub>2</sub>O, isoflurano, benzodiazepinas, barbituratos y anticonvulsivos (Olney *et al.*, 2002d) provocando neurodegeneración apoptótica). Esto es especialmente cierto dado que a menudo sólo se requiere una única exposición, incluso a dosis anestésicas (Ikonomidou *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2003).

30 El documento WO 02/22116 da a conocer combinaciones anestésicas de xenón con isoflurano, desflurano o sevoflurano. El documento DE 199 33 704 da a conocer que el xenón es un anestésico con propiedades neuroprotectoras y neuroregenerativas. NAGATA ATSUSHI *ET AL.*, "Xenon inhibits but N<sub>2</sub>O enhances ketamine-induced c-Fos expression in the rat posterior cingulate and retrosplenial cortices", ANESTHESIA AND ANALGESIA, (200102), vol. 92, nº 2, ISSN 0003-2999, páginas 362 - 368 da a conocer que el xenón suprime los efectos neuronales adversos de la ketamina.

35 HECKER KLAUS E *ET AL.*, "Minimum anesthetic concentration of sevoflurano with different xenon concentrations in swine", ANESTHESIA & ANALGESIA, (200311), vol. 97, nº 5, ISSN 0003-2999, páginas 1364 - 1369, dan a conocer combinaciones anestésicas de xenón con sevoflurano. GOTO T *ET AL.*, "THERMOREGULATORY THRESHOLDS FOR VASOCONSTRICTION IN PATIENTS ANESTHETIZED WITH VARIOUS 1-MINIMUM ALVEOLAR CONCENTRATION COMBINATIONS OF XENON, NITROUS OXIDE, AND ISOFLURANE", ANESTHESIOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF ANESTHESIOLOGISTS, FILADELFIA, PA, EE.UU., (199909), vol. 91, nº 3, ISSN 0003-3022, páginas 626 - 632, dan a conocer combinaciones anestésicas de xenón con isoflurano. WISE-FABEROWSKI L *ET AL.*, "Desflurane and sevoflurane attenuate oxygen and glucose deprivation-induced neuronal cell death", DATABASE MEDLINE, US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, EE.UU., registro de la base de datos nº NLM12826966 dan a conocer que el sevoflurano es también un anestésico conocido por su actividad neuroprotectora. WILHELM S *ET AL.*, "EFFECTS OF XENON ON IN VITRO AND IN VIVO MODELS OF NEURONAL INJURY", ANESTHESIOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF ANESTHESIOLOGISTS, FILADELFIA, PA, EE.UU., (200206), vol. 96, nº 6, ISSN 0003-3022, páginas 1485 - 1491, dan a conocer que el xenón es un anestésico con propiedades neuroprotectoras y neurodegenerativas. MA D *ET AL.*, "NEUROPROTECTIVE AND NEUROTOXIC PROPERTIES OF THE 'INERT' GAS, XENON", BRITISH JOURNAL OF ANAESTHESIA, BJM PUBLISHING GROUP, LONDRES, RU, (200211), vol. 89, nº 5, ISSN 0007-0912, páginas 739 - 746, dan a conocer que el xenón es un anestésico con propiedades neuroprotectoras y neurodegenerativas. JEVTOVIC-TODOROVIC VESNA *ET AL.*, "Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits", THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE: THE OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. 1 de febrero de 2003, (20030201), vol. 23, nº 3, ISSN 1529-2401, páginas 876 - 882, dan a conocer que el tratamiento anestésico neonatal con isoflurano da como resultado una neurodegeneración dependiente de la dosis y que esta neurodegeneración se potencia cuando se añade N<sub>2</sub>O al cóctel anestésico.

Desarrollo neuronal normal

60 El desarrollo neuronal normal es una secuencia cuidadosamente regulada (Butler, 1999) de acontecimientos que incluye proliferación, diferenciación, migración y sinaptogénesis. Se cree que el glutamato presenta un papel en todos estos procesos (Ikonomidou y Lechoslaw, 2002), por ejemplo altas concentraciones de glutamato en zonas diana de migración sugiere un papel como quimioatrayente neuronal (Behar *et al.*, 1999) junto con el receptor de NMDA utilizado para detectarlo (Komuro y Rakic, 1993). El hallazgo intrigante de subtipos de receptor de NMDA

específicos (por ejemplo NR2B y NR2D) en diferentes regiones anatómicas puede arrojar luz sobre la naturaleza precisa del control de la migración (Behar *et al.*, 1999). De un trabajo del mismo grupo, también es evidente que diferentes especies emplean diferentes mediadores en el control de la migración, actualmente o bien GABA (ratas) o bien glutamato (ratones) (Behar *et al.*, 2001).

5 La sinaptogénesis (el aumento de crecimiento cerebral) es un periodo de un establecimiento rápido de sinapsis, caracterizado por un alto nivel de muerte celular fisiológica (hasta el 1% (Olney *et al.*, 2002b)). Esto incluye la formación de proyecciones corticotalámicas y talamocorticales extensas (Molar y Blakemore, 1995). A pesar de la inmensa complejidad de la embriología entre las especies, se ha mostrado que pueden hacerse comparaciones porque los hitos del desarrollo neuronal tienden a producirse en la misma secuencia (Clancy *et al.*, 2001). Esto permite una extrapolación del periodo de actividad sinaptogénica pico desde la cría de rata de 7 días de edad (Olney *et al.*, 2002a) hasta un ser humano de 0-8 meses de edad (Ikonomidou *et al.*, 1999; Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2003). Sin embargo, basándose en el análisis de subtipos de receptor de NMDA, es más probable que los seres humanos experimenten un periodo prolongado de sinaptogénesis, desde el comienzo del 3<sup>er</sup> trimestre de embarazo hasta varios años de edad (Dobbing y Sands, 1979; Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2003).

#### Apoptosis en el sistema nervioso en desarrollo

20 La apoptosis, descrita formalmente por primera vez en 1972 (Kerr *et al.*, 1972), es una característica esencial del desarrollo neuronal normal en procesos tales como esculpir, cortar, control de los números de células y eliminación celular. Se caracteriza como "muerte celular activa" que comprende iniciación, destinación y ejecución por proteínas celulares dedicadas (Sloviser, 2002). El papel crucial de la apoptosis se destaca por el hecho de que la regulación por incremento o regulación por disminución genética de la apoptosis da como resultado un genotipo letal (Yoshida *et al.*, 1998; Rinkenberger *et al.*, 2000).

Actualmente, se cree que el control de la muerte celular fisiológica (PCD) en el SNC inmaduro está gobernado por la hipótesis neurotrófica, mediante la cual las neuronas que no pueden alcanzar sus dianas sinápticas promotoras de la supervivencia (Sherrard y Bower, 1998) inician una forma especializada de suicidio celular secundario a la retirada del soporte trófico del entorno (Young *et al.*, 1999) (por medio de tanto neurotrofinas como estimulación eléctrica) (Brenneman *et al.*, 1990). Debido a la naturaleza divergente y convergente compleja de la "ruta de supervivencia" muchos ligandos y mecanismos están implicados en el mantenimiento de la supervivencia neuronal. El citosol y las mitocondrias de neuronas despliegan una diversidad equilibrada de moléculas que son o bien antiapoptóticas (por ejemplo proteína de unión de respuesta a AMPc y Bcl-2) o proapoptóticas (por ejemplo Bad, Bax y la familia de caspasa) que determinan el destino celular. Se cree que Bcl-2 y sus péptidos asociados son particularmente importantes en el desarrollo del SNC (Yuan y Yanker, 2000), tal como se evidencia por los altos niveles de expresión en el neonato y el hecho de que la sobreexpresión experimental de Bcl-2 pueda tanto anular la falta de soporte trófico (García *et al.*, 1992), e incluso impedir la PCD completamente (Martinou *et al.*, 1994). Una variante de Bcl-2 (Bcl-XL) puede presentar un papel especializado en el mantenimiento de neuronas en desarrollo antes de que hayan encontrado sus dianas sinápticas (Motoyama *et al.*, 1995).

#### Neurodegeneración en neonatos

45 En 1999, se publicaron datos que mostraban que la utilización de antagonistas de receptores de NMDA en ratas neonatales producía patrones específicos de neurodegeneración (distintos de células gliales) (Ikonomidou *et al.*, 1999). En microscopía electrónica, esta neurodegeneración era idéntica a la muerte celular apoptótica, y lo más evidente en el núcleo talámico laterodorsal, una de las zonas del cerebro implicadas en el aprendizaje y en la memoria (Goen *et al.*, 2002). Este fenómeno se ha demostrado en otras regiones cerebrales con otros fármacos (Monti y Contestabile, 2000).

Un trabajo posterior realizado por Jevtovic-Todorovic *et al.* mostró que las ratas neonatales son vulnerables a los efectos secundarios perjudiciales de la anestesia durante el periodo sinaptogénico. Demostraron un aumento de hasta 68 veces en el número de neuronas en degeneración por encima del nivel inicial en áreas tales como los núcleos talámicos laterodorsal y anteroventral (y en algún grado la capa II de la corteza parietal) tras la exposición a agentes anestésicos (Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2003), lo que dio como resultado un déficit neurológico funcional en pruebas de comportamiento posteriores en la vida. Específicamente, el anestésico GABAérgico isoflurano (Gyulai *et al.*, 2001), produjo una neurodegeneración dependiente de la dosis por sí mismo, con neurodegeneración sinérgica con la adición sucesiva de midazolam (un cóctel GABAérgico doble) y luego N<sub>2</sub>O (un cóctel triple) (Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2003). Se ha mostrado que este proceso se produce con la exposición a agentes GABAérgicos en áreas distintas de anestesia, tales como terapia anticonvulsiva y consumo de fármacos maternos en ratas (Bittigau *et al.*, 2002; Farber y Olney, 2003).

Una manifestación clínica de este tipo de neurodegeneración se detecta en de 1 a 2 lactantes por 1000 nacimientos vivos como síndrome alcohólico fetal (FAS) (Moore y Persaud, 1998), caracterizado por características faciales anómalas, microencefalia y discapacidad intelectual (Olney *et al.*, 2002c). Se cree que

una borrachera de madres embarazadas produce niveles muy altos de etanol (un antagonista de receptor de NMDA y agente GABAérgico doble (Farber y Olney, 2003)) en el cerebro fetal, que a su vez desencadena el tipo de neurodegeneración comentada anteriormente (Ikonomidou *et al.*, 2000). Merece la pena indicar que este mecanismo de acción se asemeja estrechamente a los procedimientos anestésicos actuales.

5

La presente invención busca proporcionar un agente anestésico adecuado para su utilización en el recién nacido que sea seguro, eficaz y no presente ningún efecto adverso sobre el desarrollo neuronal. Más específicamente, la invención busca proporcionar un agente anestésico para sujetos neonatales que sea adecuado para su utilización en combinación con otros anestésicos que se sabe que afectan de manera adversa al desarrollo neuronal. En particular, la invención busca proporcionar combinaciones anestésicas para su utilización en neonatos que comprendan un agente que puede prevenir o aliviar los efectos adversos de agentes anestésicos conocidos tales como isoflurano y/o sevoflurano y/o desflurano.

10

### Exposición de la invención

15

En un aspecto amplio, la presente invención se refiere a la utilización de xenón para prevenir uno o más déficits neurológicos inducidos por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.

20

Diversos aspectos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas y en la descripción detallada a continuación.

### Descripción detallada

25

Un primer aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir uno o más déficits neurológicos inducidos por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.

30

Está bien documentado en la técnica que la exposición a anestésicos, incluyendo antagonistas de receptores de NMDA tales como N<sub>2</sub>O, ketamina y otros agentes tales como isoflurano, desencadena neurodegeneración apoptótica durante la fase sinaptogénica de desarrollo cerebral. Estudios han demostrado que el xenón, por sí mismo un antagonista de receptor de NMDA, no sólo carece de la toxicidad característica producida por ketamina y N<sub>2</sub>O en ratas adultas, sino que también mejora su toxicidad. Los experimentos detallados en la presente memoria han investigado las propiedades del xenón en un modelo de rata neonatal de neurodegeneración.

35

Se utilizó un modelo de rata *in vivo* de anestesia conjuntamente con tanto histología como inmunohistoquímica para identificar y cuantificar la apoptosis inducida por diversas combinaciones de agentes anestésicos. A diferencia del isoflurano, el xenón no indujo ninguna neurodegeneración apoptótica por encima del nivel inicial observado en los controles. Adicionalmente, se encontró que, aunque el óxido nítrico potencia la apoptosis inducida por isoflurano, el xenón reduce el grado de lesión.

40

A modo de resumen, se expusieron ratas Sprague-Dawley de siete días de edad a un 25% de oxígeno junto con una de varias combinaciones de gases (el 75% de nitrógeno, el 75% de óxido nítrico, el 75% de xenón, el 0,75% de isoflurano, el 75% de óxido nítrico + el 0,75% de isoflurano, el 60% de xenón + el 0,75% de isoflurano) durante 6 horas (n = 3-5/grupo). Se sacrificaron las ratas tras la anestesia, y se procesaron sus cerebros para evaluar la gravedad de la apoptosis (utilizando inmunohistoquímica de caspasa-3, inmunohistoquímica de c-Fos y tinción con plata de DeOlmos).

45

Cuando se administraron solos, ni N<sub>2</sub>O ni xenón provocaron un aumento significativo en células positivas para caspasa-3 en el hipocampo o la corteza (valores corticales: 22,5 ± 5,9 y 19,7 ± 9,6 respectivamente frente a 19,3 ± 6,4 en controles; p > 0,05). En cambio, el isoflurano solo, aumentó significativamente el número de neuronas en degeneración en ambas regiones (76,5 ± 11,4; p < 0,01). De manera similar, el sevoflurano solo, provocó un aumento significativo en las neuronas en degeneración con respecto a un valor de control de 20,0 ± 2 células positivas a 42 ± 2 células positivas cuando se administró sevoflurano al 1,5%. Cuando se combinó con isoflurano, N<sub>2</sub>O potenció considerablemente la apoptosis inducida por isoflurano (232,0 ± 19,9; p < 0,001 frente al aire) mientras que el xenón redujo la lesión (26,7 ± 3,9; p > 0,05 frente al aire).

50

Estos datos sugieren que el xenón, a diferencia de otros anestésicos que presentan bloqueo del receptor de NMDA, no potencia la neurodegeneración apoptótica en la rata neonatal. De hecho, parece que el xenón protege frente a la apoptosis inducida por isoflurano.

60

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto neonatal" se refiere a un sujeto recién nacido. Preferentemente el sujeto neonatal es un mamífero en las primeras cuatro semanas tras el nacimiento. Más preferentemente, el sujeto neonatal es un mamífero en las primeras dos semanas, más preferentemente todavía, la primera semana tras el nacimiento.

65

Incluso más preferentemente, el sujeto neonatal es un ser humano.

En una forma de realización preferida, el sujeto neonatal es un sujeto que se somete a, o requiere, cirugía fetal.

5 En una forma de realización preferida, el sujeto neonatal es un sujeto que presenta un estado potencialmente mortal que requiere cirugía emergente o electiva posteriormente en la vida.

En otra forma de realización preferida, el sujeto neonatal recibe xenón indirectamente como parte de un régimen anestésico o analgésico administrado a la madre durante el parto, o durante la cesárea.

10 Preferentemente, el medicamento es para prevenir y/o aliviar uno o más déficits neurológicos inducidos por anestésicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “prevenir y/o aliviar déficits neurológicos” se refiere a reducir la gravedad de uno o más déficits neurológicos en comparación con un sujeto que se ha sometido a tratamiento con un anestésico en ausencia de xenón.

20 Preferentemente, el déficit neurológico es un déficit de aprendizaje, de memoria, neuromotor, neurocognitivo y/o psicocognitivo.

25 En una forma de realización incluso más preferida, el déficit neurológico puede ser un déficit neuromotor o neurocognitivo. Tal como se utiliza en la presente memoria al término “déficit neuromotor” se le da su significado tal como entiende el experto en la técnica para incluir déficits en fuerza, equilibrio y movilidad. De manera similar, al término “déficit neurocognitivo” se le da su significado tal como entiende el experto en la técnica para incluir déficits en el aprendizaje y la memoria. Tales déficits neurocognitivos pueden evaluarse normalmente mediante criterios bien establecidos tales como el módulo de historias cortas de la prueba de memoria de Randt [Randt C, Brown E. Administration manual: Randt Memory Test. Nueva York: Life Sciences, 1983], la subprueba de amplitud de dígitos y la subprueba de símbolos digitales de la escala de inteligencia de adultos de Wechsler revisada [Wechsler D. The Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised (WAISR). San Antonio, Tex.: Psychological Corporation, 1981], la prueba de retención visual revisada de Benton [Benton AL, Hansher K. Multilingual aphasia examination. Iowa City: University of Iowa Press, 1978] y la prueba de marcaje del rastro (parte B) [Reitan RM. Validity of the Trail Making Test as an indicator of organic brain damage. Percept Mot Skills 1958; 8:271-6]. Otras pruebas neuromotoras y neurocognitivas apropiadas se describen en Combs D, D'Alecy L: Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: Effect of fasting and 1,3-butanediol. Stroke 1987; 18: 503-511 y Gionet T, Thomas J, Warner D, Goodlett C, Wasserman E, West J: Forebrain ischemia induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats. Stroke 1991; 22: 1040-1047).

35 En una forma de realización preferida, el déficit neurológico es neurodegeneración.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “neurodegeneración” se refiere a contracción celular, aglutinación de cromatina con marginación y formación de cuerpos apoptóticos encerrados en la membrana; con la aplicación de anticuerpo frente a caspasa 3 las neuronas en neurodegeneración se tiñen de negro al aplicar 3,3'-diamino-bencidina (dab).

45 En otra forma de realización preferida, el déficit neurológico está asociado con apoptosis neuronal.

En otra forma de realización preferida, el déficit neurológico está asociado con necrosis neuronal.

50 En otra forma de realización preferida, el déficit neurológico es un déficit de aprendizaje, de memoria, neuromotor o psicocognitivo.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la neurodegeneración inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal.

55 Un tercer aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la apoptosis neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal.

60 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la lesión neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal.

65 Para todos los aspectos anteriores, preferentemente el anestésico es un agente anestésico volátil. Los ejemplos de anestésicos volátiles incluyen isoflurano, sevoflurano y desflurano.

Para todos los aspectos anteriores, preferentemente el anestésico es un agente GABAérgico tal como isoflurano, sevoflurano o desflurano. Más preferentemente, el anestésico es isoflurano, sevoflurano o desflurano.

5 El isoflurano es un anestésico volátil halogenado que induce y mantiene una anestesia general mediante depresión del sistema nervioso central y pérdida resultante de la conciencia. A lo largo de todo el mantenimiento de la anestesia, se elimina una alta proporción del isoflurano por los pulmones. Cuando se detiene la administración, el volumen del isoflurano restante se elimina sin cambios de los pulmones. Puesto que la solubilidad del isoflurano es baja, la recuperación de la anestesia de isoflurano en el hombre es rápida.

10 Puesto que el isoflurano presenta una leve acritud, la inhalación va precedida habitualmente por la elección de un barbitúrico de acción corta, u otro agente de inducción intravenoso, para prevenir la tos. El isoflurano puede inducir un aumento de la salivación y tos en niños pequeños tras la administración. Las reacciones adversas que se encuentran con el isoflurano son similares a las observadas con otros anestésicos halogenados e incluyen hipotensión, depresión respiratoria y arritmias. Otros efectos secundarios minoritarios que se encuentran cuando se utiliza isoflurano son un aumento en el recuento de glóbulos blancos (incluso en ausencia de estrés quirúrgico) y también escalofríos, náuseas y vómitos durante el periodo posoperatorio. También ha habido informes poco comunes de disfunción hepática posoperatoria leve, moderada y grave (algunas mortales). La relación causal de esto se desconoce.

20 El isoflurano provoca un aumento en el flujo de sangre cerebral a niveles más profundos de anestesia; esto puede dar lugar a un aumento en la presión en líquido cefalorraquídeo cerebral. Cuando sea apropiado, esto puede prevenirse o revertirse mediante hiperventilación del paciente antes o durante la anestesia. Como con otros anestésicos halogenados, puede utilizarse el isoflurano con precaución en pacientes con presión intracraneal aumentada.

25 El isoflurano es un dilatador de arterias coronales y sistémico potente. El efecto sobre la tensión arterial sistémica se controla fácilmente en el paciente sano normal y se ha utilizado específicamente como medio de inducción de hipotensión. Sin embargo, el fenómeno de “robo coronario” significa que el isoflurano debe utilizarse con precaución en pacientes con arteriopatía coronaria. En particular, podría anticiparse que pacientes con isquemia subendocárdica son más susceptibles.

30 El sevoflurano, un metil-isopropil éter fluorado es relativamente agradable y sin acritud y se utiliza para provocar anestesia general antes y durante la cirugía. Se administra por inhalación. Puesto que presenta un coeficiente de reparto en sangre/gas de sólo 0,6, los tiempos de inicio y recuperación son rápidos.

35 La dosis de sevoflurano requerida varía de paciente a paciente, dependiendo de la edad, el estado físico, las interacciones con otros medicamentos y el tipo de cirugía que está realizándose. Los efectos secundarios incluyen bradicardia, hipotensión, taquicardia, agitación, laringoespasma, obstrucción de las vías respiratorias, tos, mareo, somnolencia, aumento de la cantidad de saliva, náusea, escalofríos, vómitos, fiebre, hipotermia, movimiento, cefalea. Puesto que el sevoflurano se metaboliza muy lentamente en el cuerpo humano, existe un alto riesgo de toxicidad renal. Cuando se utiliza en niños, se ha sabido que el sevoflurano provoca un aumento de la agitación.

45 En el contexto de la presente invención, el xenón puede administrarse al sujeto simultáneamente, en combinación, secuencialmente o por separado con el agente anestésico.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, “simultáneamente” se utiliza queriendo decir que el xenón se administra conjuntamente con el agente anestésico, mientras que el término “en combinación” se utiliza queriendo decir que el xenón se administra, si no simultáneamente, luego “secuencialmente” dentro de un lapso de tiempo en el que el xenón y el anestésico muestran ambos un efecto terapéutico, es decir, están ambos disponibles para actuar terapéuticamente dentro del mismo lapso de tiempo. Por tanto, la administración “secuencial” puede permitir que el xenón se administre en el plazo de 5 minutos, 10 minutos o una cuestión de horas antes o después del anestésico.

55 En una forma de realización particularmente preferida, el xenón se administra al sujeto antes del agente anestésico volátil. Estudios han indicado que el xenón puede cambiar la vulnerabilidad del sujeto a todas las clases de lesión de una variedad apoptótica o necrótica.

60 En una forma de realización preferida el xenón se administra antes de la lesión hipóxica-isquémica o cualquier otra lesión que sea dependiente de apoptosis (es decir, en la que la apoptosis es la ruta para la muerte celular) o dependiente de necrosis (es decir, en la que la necrosis es la ruta para la muerte celular), es decir el xenón funciona como un agente de preacondicionamiento.

65 En otra forma de realización particularmente preferida, el xenón se administra después del agente anestésico volátil. Por tanto, en una forma de realización preferida el xenón se administra tras la lesión hipóxica-isquémica o cualquier otra lesión que sea dependiente de apoptosis (es decir, en la que la apoptosis es la ruta para la muerte

celular) o dependiente de necrosis (es decir, en la que la necrosis es la ruta para la muerte celular).

5 En contraposición a “en combinación” o “secuencialmente”, “por separado” se utiliza en la presente memoria queriendo decir que el espacio entre la administración del xenón y la exposición del sujeto al agente anestésico es significativo, es decir el xenón puede no estar presente ya en el torrente sanguíneo en una cantidad terapéuticamente eficaz cuando el sujeto se expone al agente anestésico, o el anestésico puede no estar presente ya en el torrente sanguíneo en una cantidad terapéuticamente eficaz cuando el sujeto se expone al xenón.

10 Más preferentemente, el xenón se administra secuencialmente o simultáneamente con el agente anestésico, más preferentemente simultáneamente.

15 Más preferentemente, el xenón se administra antes de, o simultáneamente con, el agente anestésico, más preferentemente simultáneamente.

En una forma de realización preferida de la invención, el xenón se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

20 En otra forma de realización preferida, el xenón se administra en una cantidad subterapéuticamente eficaz. En este contexto, el término “cantidad subterapéuticamente eficaz” significa una cantidad que es menor que la cantidad normalmente requerida para producir anestesia.

25 Generalmente, una atmósfera de aproximadamente el 70% de xenón es suficiente para inducir o mantener la anestesia. Por consiguiente, una cantidad subterapéutica de xenón corresponde a menos de aproximadamente el 70% de xenón.

Incluso más preferentemente, la combinación de xenón y agente anestésico presenta un efecto sinérgico, es decir, la combinación es sinérgica.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de (i) xenón y (ii) un anestésico seleccionado de entre isoflurano, sevoflurano y desflurano, en la preparación de un medicamento para prevenir la lesión neuronal inducida por isoflurano y/o inducida por sevoflurano y/o inducida por desflurano en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de (i) xenón y (ii) isoflurano, en la preparación de un medicamento para prevenir la lesión neuronal inducida por isoflurano en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de (i) xenón y (ii) sevoflurano, en la preparación de un medicamento para prevenir la lesión neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de (i) xenón, y (ii) desflurano, en la preparación de un medicamento para prevenir la lesión neuronal inducida por desflurano en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal.

50 Aún otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la lesión neuronal inducida por isoflurano y/o inducida por sevoflurano y/o por desflurano en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal.

55 Aún otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de (i) xenón y (ii) un anestésico seleccionado de entre isoflurano, sevoflurano y desflurano, en la preparación de un medicamento para proporcionar anestesia en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, en el que la cantidad de xenón es suficiente para prevenir la lesión inducida por anestésicos GABAérgicos.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón e isoflurano en la preparación de un medicamento para proporcionar anestesia en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, en el que la cantidad de xenón es suficiente para prevenir la lesión neuronal inducida por isoflurano.

60 Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón y sevoflurano en la preparación de un medicamento para proporcionar anestesia en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, en el que la cantidad de xenón es suficiente para prevenir la lesión neuronal inducida por sevoflurano.

65 Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón y desflurano en la preparación de un medicamento para proporcionar anestesia en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, en el que la cantidad de xenón es suficiente para prevenir la lesión neuronal inducida por desflurano.

Para todos los aspectos anteriores, preferentemente el xenón se administra en combinación con un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable.

5 Pueden encontrarse ejemplos de tales excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller.

10 Se conocen bien en la técnica farmacéutica portadores o diluyentes aceptables para utilización terapéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Los ejemplos de portadores adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

15 La elección de portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, portador, excipiente o diluyente cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante adecuado.

20 Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

25 Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares.

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizadores y colorantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido de p-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

30 El xenón también puede administrarse en combinación con otro agente farmacéuticamente activo. El agente puede ser cualquier agente farmacéuticamente activo adecuado incluyendo agentes anestésicos o sedantes que promueven la actividad GABAérgica. Los ejemplos de tales agentes GABAérgicos incluyen propofol y benzodiazapinas.

35 El xenón también puede administrarse en combinación con otros principios activos tales como bloqueantes de canales de calcio de tipo L, bloqueantes de canales de calcio de tipo N, antagonistas de sustancia P, bloqueantes de canales de sodio, bloqueantes de receptores purinérgicos, o combinaciones de los mismos.

40 El xenón puede administrarse mediante cualquier mecanismo adecuado, o dos o más mecanismos de administración adecuados.

45 En una forma de realización particularmente preferida, el xenón se administra por perfusión. En el contexto de la presente invención, el término "perfusión" se refiere a la introducción de una mezcla de oxígeno/xenón en, y a la eliminación de dióxido de carbono de, un paciente utilizando una máquina cardiopulmonar especializada. En términos generales, la máquina cardiopulmonar reemplaza la función del corazón y los pulmones y proporciona un campo quirúrgico sin sangre, sin movimiento para el cirujano. El perfusionista ventila la sangre del paciente para controlar el nivel de oxígeno y dióxido de carbono. En el contexto de la presente invención, el perfusionista también introduce xenón en la sangre del paciente. El perfusionista impulsa entonces la sangre de nuevo al sistema arterial para proporcionar un flujo de sangre con nutrientes a todos los tejidos y órganos vitales del paciente durante la cirugía cardíaca.

50 En una forma de realización preferida, el medicamento está en forma gaseosa. En otra forma de realización muy preferida, el xenón se administra por inhalación.

55 En una forma de realización preferida, el medicamento comprende además oxígeno, nitrógeno o mezclas de los mismos, más particularmente aire.

60 En otra forma de realización preferida, el medicamento comprende además helio, NO, CO, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, otros compuestos gaseosos y/o medicamentos inhalables.

En otra forma de realización preferida, el xenón se mezcla con otro gas inerte, tal como argón o kriptón.

En otra forma de realización preferida, el xenón se mezcla con oxígeno, o un gas que contiene oxígeno.

65 En una forma de realización muy preferida, el medicamento es una mezcla gaseosa binaria que comprende desde aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 80% de xenón en volumen, más preferentemente

desde aproximadamente el 20 hasta aproximadamente el 80% de xenón en volumen, comprendiendo el resto oxígeno. En otra forma de realización preferida, el medicamento comprende desde aproximadamente el 30 hasta aproximadamente el 75% de xenón en volumen, comprendiendo el resto oxígeno.

5 En otra forma de realización muy preferida, el medicamento es una mezcla gaseosa ternaria que comprende desde aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 80% de xenón en volumen, más preferentemente desde aproximadamente el 20 hasta aproximadamente el 80% de xenón en volumen, comprendiendo el resto oxígeno y nitrógeno. En otra forma de realización preferida, el medicamento comprende desde aproximadamente el 30 hasta aproximadamente el 75% de xenón en volumen, comprendiendo el resto oxígeno y nitrógeno.

10 En otra forma de realización preferida, el medicamento comprende de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 90% en volumen de xenón, más preferentemente, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 80% en volumen de xenón, más preferentemente todavía, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 50% en volumen de xenón, más preferentemente todavía, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30% en volumen de xenón.

15 En otra forma de realización preferida, el medicamento está en forma de un líquido o una disolución. En una forma de realización particularmente preferida, el medicamento está en forma de una emulsión lipídica.

20 Preferentemente, el líquido se administra en forma de una disolución o una emulsión preparada a partir de disoluciones estériles o esterilizables, que pueden inyectarse por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía intratecal, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intraperitoneal o por vía intramuscular.

25 En una forma de realización particularmente preferida, el xenón se administra en forma de una emulsión lipídica. La formulación intravenosa contiene normalmente una emulsión lipídica (tal como las emulsiones disponibles comercialmente Intralipid®10, Intralipid®20, Intrafat®, Lipofundin®S o Liposyn®, o una especialmente formulada para maximizar la solubilidad) que aumenta suficientemente la solubilidad del xenón para lograr el efecto clínico deseado. Puede encontrarse información adicional sobre emulsiones lipídicas de esta clase en G. Kleinberger y H. Pamperl, Infusionstherapie, 108-117 (1983) 3.

30 La fase lipídica de la presente invención que disuelve o dispersa el gas se forma normalmente a partir de ésteres de ácidos grasos de cadena media y larga saturados e insaturados que contienen de 8 a 30 átomos de carbono. Estos lípidos forman liposomas en disolución acuosa. Los ejemplos incluyen aceite de pescado y aceites vegetales tales como aceite de soja, aceite de cardo o aceite de semilla de algodón. Las emulsiones lipídicas de la invención son normalmente emulsiones de aceite en agua en las que la proporción de grasa en la emulsión es convencionalmente del 5 al 30% en peso, y preferentemente del 10 al 20% en peso. Las emulsiones de aceite en agua de esta clase se preparan a menudo en presencia de un agente emulsionante tal como un fosfatido de soja.

35 Los lípidos que forman los liposomas de la presente invención pueden ser naturales o sintéticos e incluyen colesterol, glicolípidos, esfingomielina, glucolípidos, glicoesfingolípidos, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidil-serina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol.

40 Las emulsiones lipídicas de la presente invención también pueden comprender componentes adicionales. Estos pueden incluir antioxidantes, aditivos que hacen que la osmolaridad de la fase acuosa que rodea a la fase lipídica sea isotónica con la sangre o polímeros que modifican la superficie de los liposomas.

45 Se ha establecido que pueden añadirse cantidades apreciables de xenón a una emulsión lipídica. Incluso mediante los medios más sencillos, a 20°C y presión normal, el xenón puede disolverse o dispersarse en concentraciones de 0,2 a 10 ml o más por ml de emulsión. La concentración de gas disuelto depende de varios factores, incluyendo temperatura, presión y la concentración de lípido.

50 Las emulsiones lipídicas de la presente invención pueden cargarse con xenón gaseoso. En general, se llena un dispositivo con la emulsión y se hacen pasear anestésicos como gases o vapores a través de burbujeadores de vidrio sinterizados sumergidos en la emulsión. Se permite que la emulsión se equilibre con el gas o vapor anestésico a una presión parcial elegida. Cuando se almacenan en recipientes herméticos a los gases, estas emulsiones lipídicas muestran una estabilidad suficiente para que el anestésico no se libere como un gas a lo largo de periodos de almacenamiento convencionales.

55 Las emulsiones lipídicas de la presente invención pueden cargarse de modo que el xenón está al nivel de saturación. Alternativamente, el xenón puede estar presente en concentraciones inferiores, siempre que, por ejemplo, la administración de la emulsión produzca la actividad farmacéutica deseada.

60 La concentración de xenón empleada en la invención puede ser la concentración mínima requerida para lograr el efecto clínico deseado. Es habitual para un médico determinar la dosificación real que será la más adecuada para un paciente individual, y esta dosis variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Puede haber, por supuesto, casos individuales en los que se exigen intervalos de dosificación superiores o inferiores, y

tales están dentro del alcance de esta invención.

Preferentemente, el medicamento está en una forma apta para la administración intravenosa, neuraxial o transdérmica.

- 5 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de prevención de déficits neurológicos inducidos por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.
- 10 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de prevención de la neurodegeneración inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.
- 15 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de prevención de la apoptosis neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.
- 20 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de prevención de la lesión neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.
- 25 Un método de prevención de la lesión neuronal inducida por isoflurano en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto xenón e isoflurano.
- 30 Un método de prevención de la lesión neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto xenón y sevoflurano.
- 35 Un método de prevención de la lesión neuronal inducida por desflurano en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto xenón y desflurano.
- 40 Un método para proporcionar anestesia y/o analgesia en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar xenón en combinación con isoflurano, en el que la cantidad de xenón es suficiente para prevenir la lesión neuronal inducida por isoflurano.
- 45 Un método para proporcionar anestesia y/o analgesia en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar xenón en combinación con sevoflurano, en el que la cantidad de xenón es suficiente para prevenir la lesión neuronal inducida por sevoflurano.
- 50 Un método para proporcionar anestesia y/o analgesia en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicho método administrar xenón en combinación con desflurano, en el que la cantidad de xenón es suficiente para prevenir la lesión neuronal inducida por desflurano.
- 55 Las formas de realización preferidas para todos los métodos anteriores son idénticas a las facilitadas anteriormente para los aspectos de utilización correspondientes.
- 60 Aún otro aspecto de la invención se refiere a una formulación anestésica para prevenir uno o más déficits neurológicos inducidos por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicha formulación xenón y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable.
- 65 Aún otro aspecto de la invención se refiere a una formulación anestésica para prevenir la neurodegeneración inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicha formulación xenón y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable.
- Un aspecto adicional de la invención se refiere a una formulación anestésica para tratar y/o aliviar y/o prevenir la apoptosis neuronal inducida por anestésicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicha formulación xenón y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable. Un aspecto adicional de la invención se refiere a una formulación anestésica para prevenir la necrosis neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto, preferentemente un sujeto neonatal, comprendiendo dicha formulación xenón y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable.
- En una forma de realización preferida, la formulación anestésica de la invención comprende además un agente GABAérgico como agente anestésico.
- Más preferentemente, el agente anestésico es isoflurano, sevoflurano o desflurano.
- Otro aspecto de la invención se refiere a una formulación anestésica que comprende el 60% de xenón, el 0,75%

de isoflurano, el 25% de oxígeno y con el resto como nitrógeno.

### Xenón

5 Como gas anestésico, el xenón presenta muchas cualidades deseables incluyendo cardioestabilidad (Stowe *et al.*, 2000), un bajo coeficiente de sangre-gas (Nakata *et al.*, 1997) (la explicación de los rápidos tiempos de inducción y emergencia del xenón), y un potente efecto analgésico (Ma *et al.*, 2004). Dada la inevitable aplicación restringida de este gas extremadamente costoso y raro, el xenón puede encontrar un nicho como anestésico neuroprotector intraoperatorio profiláctico (Mayumi Homi *et al.*, 2003).

10 Los efectos neuroprotectores del xenón se han observado en modelos *in vivo* de lesión neuronal aguda que implican la administración de excitotoxinas a ratas (Ma *et al.* 2002), derivación cardiopulmonar en ratas (Ma *et al.* 2003b), oclusión de la arteria cerebral media en ratones (Homi *et al.*, 2003), parada cardiaca en cerdos (Schmidt *et al.* 2005), e hipoxia-isquemia en ratas neonatales (Ma *et al.*, 2005). El xenón era un agente neuroprotector más eficaz que o bien gavestinel (Ma *et al.*, 2005) o bien dizolcipina (Ma *et al.* 2003a), otros dos antagonistas de NMDA que se han sometido a prueba clínicamente.

20 El trabajo *in vitro* ha mostrado que el xenón puede proteger frente a la excitotoxicidad inducida por tanto glutamato como privación de oxígeno y glucosa (Wilhelm *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003a). A concentraciones anestésicas *in vivo* (75%), se ha mostrado que el xenón protege de manera dependiente de la dosis frente a ataques excitotóxicos con la misma eficacia neuroprotectora que MK801 (Ma *et al.*, 2002). Adicionalmente, los mismos experimentos mostraron que incluso a esta dosis relativamente alta de xenón, no hay evidencias de ninguna neurotoxicidad en las cortezas retrosplenial o cingulada posterior. Estudios más recientes han mostrado que la anestesia basada en xenón proporciona una mejora neurológica funcional en ratas sometidas a derivación cardiopulmonar (Ma *et al.*, 2003b).

25 Experimentos de electrofisiología han caracterizado al xenón como un potente inhibidor no competitivo postsináptico (De Sousa *et al.*, 2000) de receptores de NMDA con pocos o ningún efecto mediado por GABA (Franks *et al.*, 1998). Aunque éste puede ser el mecanismo detrás del efecto anestésico, es casi cierto que el xenón presenta otros sitios de acción que aún han de dilucidarse. Esta teoría está apoyada por la capacidad del xenón para actuar en oposición a otros antagonistas de receptores de NMDA, atenuando sus efectos neurotóxicos (Nagata *et al.*, 2001).

30 Hasta la fecha, hay relativamente pocos datos sobre los efectos del xenón sobre el neonato. En cuanto a la seguridad, los estudios han mostrado que el xenón, en contraposición a N<sub>2</sub>O, no interfiere con el control PKC del axón en extensión *in vitro* (Fukura *et al.*, 2000) ni presenta propiedades teratogénicas *in vivo* (Lane *et al.*, 1980). Con respecto a la eficacia, se ha mostrado que el xenón es un agente analgésico eficaz en ratas neonatales (Ma *et al.*, 2004).

### El modelo de rata *in vivo* de anestesia: protocolo

40 Experimentos preliminares sugirieron que el 75% de xenón + el 0,75% de isoflurano era una dosis demasiado alta para crías de rata neonatales (que induce apnea en el 100% de los sujetos de prueba en el plazo de 10 min). Esto se respalda por los datos existentes de que el xenón es un anestésico y analgésico más potente que el óxido nitroso (Sanders *et al.*, 2003). Se sustituyó por el 60% de isoflurano + el 0,75% de isoflurano como una concentración que era más probablemente de MAC equivalente con el 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano.

50 Sprague-Dawley es una raza consanguínea que presenta determinadas diferencias fenotípicas con respecto a ratas utilizadas en estudios anteriores. Específicamente, cuando se intentó reproducir regímenes de dosis alta utilizados previamente (Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2003), por ejemplo el 75% de N<sub>2</sub>O % + el 1% de isoflurano + midazolam 6 mg/kg, las ratas mostraron un alto grado de sensibilidad (las tasas de mortalidad habrían sido del 100% en ausencia de intervención hasta finalizar la exposición anestésica). Por tanto, las concentraciones de gas para cada grupo tenían que adaptarse para inducir un estado de anestesia sin producir apnea.

### Caracterización de neurodegeneración

60 Se ha demostrado repetidamente que la técnica cúprica-argéntica (tinción con plata de DeOlmos) es excelente para destacar la densidad y la distribución de neurodegeneración (Beltramino *et al.*, 1993; Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2003). El procedimiento destaca la argirofilia (una respuesta generalizada del SNC a la lesión (O'Callaghan y Jensen, 1992)) para revelar la neurodegeneración acumulativa, por lo que no se aplican cuestiones que rodean al pequeño intervalo de tiempo de la expresión del marcador, como en otras técnicas que identifican productos génicos y activación enzimática (DeOlmos e Ingram, 1971).

65 La inmunohistoquímica de caspasa-3 parecía estar actuando como marcador adecuado de la apoptosis neuronal. Como enzima citoplasmática, las células teñidas con caspasa-3 activada se teñían en su totalidad,

haciendo por tanto la cuantificación relativamente sencilla.

Al final de la cascada de señalización apoptótica, la caspasa-9 activa a la caspasa-3 (una cisteína proteasa), y por tanto la caspasa-3 es un marcador de aquellas células posteriores al punto de implicación apoptótica. Aunque ampliamente análoga a la tinción con plata, la inmunohistoquímica con caspasa-3 es superior tanto para fines de cuantificación como para la caracterización de la muerte celular fisiológica (Olney *et al.*, 2002b).

C-Fos es uno de los genes tempranos inmediatos que presenta un papel en relacionar acontecimientos citoplasmáticos con la transcripción de genes nucleares (Walton *et al.*, 1998). Como regulador de la expresión génica, c-Fos indica un estado de activación neuronal, un resultado de varios posibles estímulos externos diferentes, incluyendo muerte celular apoptótica (Dragunow y Preston, 1995) y dolor (revisado en Duckhyun y Barr, 1995). Se ha demostrado previamente que C-Fos es un marcador sensible de la neurotoxicidad de antagonistas del receptor de NMDA en ratas adultas (Ma *et al.*, 2002) y es válido para la evaluación de la activación del receptor de NMDA (Hasegawa *et al.*, 1998). El protocolo de inmunohistoquímica de c-Fos (Ma *et al.*, 2002), constituía toda la base de cuantificación en pruebas con formalina en médula espinal, tiñendo núcleos activados de negro.

#### Apoptosis inducida por anestésicos

A partir de datos existentes puede deducirse que el cerebro humano en desarrollo, tanto en el útero como en los primeros años de vida, experimenta una transformación altamente dinámica desde un fenotipo fetal hasta uno que se asemeja al fenotipo adulto. Las características distintivas de este proceso son una renovación extremadamente rápida de las sinapsis (de hasta el 20% al día (Okabe *et al.*, 1999)) y un alto nivel de apoptosis de fondo, ya que las neuronas que no alcanzan sus dianas sinápticas se eliminan, presumiblemente para preservar la eficiencia energética (Hua y Smith, 2004). Este estudio confirma que la exposición a determinados agentes anestésicos durante esta fase crítica de neurodesarrollo (sinaptogénesis) produce apoptosis en el cerebro en desarrollo. Los experimentos han demostrado que la exposición a isoflurano, un agente de inhalación GABAérgico utilizado comúnmente, induce un aumento de 4 veces en el nivel de apoptosis en la corteza. Además, el óxido nítrico (aunque no manifiesta ninguna propiedad neurodegenerativa como agente individual) muestra su potencial neurodegenerativo potenciando significativamente la apoptosis inducida por isoflurano hasta doce veces de lo que se observa en los controles. Se obtuvieron resultados similares del hipocampo, donde el isoflurano y la mezcla de isoflurano-óxido nítrico aumentaron el nivel de apoptosis (4 veces y 7 veces, respectivamente).

El hipocampo, un pliegue especializado del tejido cortical que forma parte del sistema límbico, tiene una función importante en la formación de la memoria (Aggleton y Brown, 1999).

Las neuronas en el hipocampo presentan la capacidad de mostrar el fenómeno conocido como “potenciación a largo plazo” (LTP), por lo que la eficacia sináptica se refuerza progresivamente mediante patrones específicos de actividad neural. Se piensa que este proceso es la base de la memoria a nivel celular. De manera clásica, el procesamiento hipocámpico tiene lugar tanto en el hipocampo como en la circunvolución parahipocámpica (subículo), antes de proyectarse al trigono cerebral. Dado el grado de lesión neuronal en el hipocampo y el subículo, no es sorprendente que ratas expuestas a altos niveles de anestésicos como neonatos muestren signos de deficiencias de aprendizaje como adultos (Jevtic-Todorovic *et al.*, 2003) respaldado por el hallazgo de supresión de LTP en el mismo estudio.

Dadas las claras implicaciones para anestesia pediátrica, está en marcha mucho trabajo para caracterizar el mecanismo tras este proceso. Se sabe que la activación tanto del receptor de GABA como del receptor de NMDA influye en la señalización de supervivencia para las neuronas (Brunet *et al.*, 2001; Bittigau *et al.*, 2002). Teniendo esto en cuenta, el ratón intoxicado con etanol ha constituido la base de un modelo animal para el estudio de este proceso. Aunque la caspasa-3 es un marcador excelente de células apoptóticas, su posición como efector final de una cascada de señalización de muerte altamente divergente ofrece poca percepción del mecanismo de apoptosis. La activación de la caspasa-3 es una etapa común para las rutas “mitocondriales” de apoptosis tanto intrínseca como extrínseca mediada por el “receptor de muerte” (Green, 2000).

Young *et al.* esperaban reducir la búsqueda a una sola ruta con una serie de experimentos elegantes. Se utilizó una combinación de inmunohistoquímica-inmunofluorescencia doble, análisis de inmunotransferencia de tipo Western y ratones con genes inactivados para destacar los componentes específicos de ruta, entre ellos Bax y citocromo c (intrínseco), y caspasa-8 (extrínseco) (Young *et al.*, 2003). Se encontró que aunque los ratones de tipo natural tratados con etanol mostraban el patrón característico de la apoptosis inducida con etanol, los ratones con Bax inactivado homocigotos a los que se administró el mismo tratamiento no mostraron prácticamente ningún signo de apoptosis en absoluto; de hecho, el nivel de apoptosis fue menor que el observado en la muerte celular fisiológica de los controles. Adicionalmente, establecieron que no tiene lugar la activación de caspasa-8. Esto implica claramente la ruta de apoptosis intrínseca en la apoptosis inducida por anestésicos. Esta ruta, centrada en torno a las mitocondrias, se controla por una variedad de mediadores pro- y anti-apoptóticos en el citosol de las neuronas. En el contexto de las neuronas en desarrollo, Bcl-X<sub>L</sub> (un miembro

de la familia de Bcl-2) es principalmente anti-apoptótico, mientras que Bax es pro-apoptótico (Yuan y Yanker, 2000). Young *et al.* lanzaron la hipótesis de que el etanol, un antagonista del receptor de NMDA y agente GABAérgico doble, presenta la capacidad de desalojar a Bax de la membrana mitocondrial, donde se almacena habitualmente en estado inactivo. Una vez en el citosol, Bax (si no se controla por Bcl-X<sub>L</sub>) llega a formar parte de un complejo activo, que a su vez puede volver a, y alterar, la membrana mitocondrial (Korsmeyer *et al.*, 2002). Se piensa que la translocación posterior del contenido mitocondrial (específicamente la parte habitualmente de citocromo c de la producción de energía celular) al interior del citosol produce una señal pro-apoptótica extremadamente poderosa. El citocromo c citosólico forma un complejo con Apaf-1 y caspasa-8, que entonces activa la caspasa-3, dando como resultado la iniciación de cascadas adicionales, produciendo en última instancia la escisión característica tanto de proteínas del citoesqueleto como del ADN (Dikranian *et al.*, 2001). Naturalmente, a partir de este análisis no es posible identificar el punto exacto en el que los anestésicos interactúan con esta ruta. Además, clases individuales de agentes pueden inducir apoptosis (por ejemplo el isoflurano solo (Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2003) y la ketamina sola (Ikonomidou *et al.*, 1999)), por lo que la utilización de un agente GABAérgico y un antagonista del receptor de NMDA doble no distingue diferencias de potencial entre las dos interacciones de receptores, aunque las cascadas intracelulares subsiguientes pueden converger posteriormente (Brunet *et al.*, 2001; Bittigau *et al.*, 2002). Es completamente posible que el isoflurano y/o el óxido nitroso puedan desregular la razón intracelular Bax/Bcl-2, quizá alterando el tráfico de calcio intracelular.

#### Utilización de xenón durante la sinaptogénesis: xenón como agente individual

La barrera hematoencefálica bloquea eficazmente la translocación de muchas sustancias solubles en agua de la sangre al SNC. Logra esto a través de una red de uniones estrechas, la cubierta de astrocitos solapante, y la ausencia relativa de mecanismos de transporte. Sin embargo, ninguna de estas medidas son un obstáculo eficaz al xenón, un átomo pequeño y apolar, que puede lograr rápidamente concentraciones anestésicas en el cerebro (Sanders *et al.*, 2003). Una vez en la sinapsis, se piensa que el xenón produce su efecto anestésico a través del bloqueo no competitivo del receptor de NMDA, aunque mediante un mecanismo que no produce un bloqueo de canal abierto típico.

Los resultados del presente estudio muestran que inducir un estado de anestesia con el 75% de xenón no produce neurodegeneración apoptótica en el cerebro neonatal. Los estudios han demostrado de manera concluyente que el bloqueo del receptor de NMDA es un elemento clave de este proceso (posiblemente a través de la privación de estimulación eléctrica o trófica), con efectos perjudiciales producidos con la utilización de MK801, ketamina, fenciclidina (PCP) y ácido carboxipiperazin-4-ilpropil-1-fosfónico (CCP) (Ikonomidou *et al.*, 1999). Por tanto, resulta peculiar que el xenón, un potente antagonista del receptor de NMDA (con el 75% de xenón equivalente a MK801 en algunos contextos (Ma *et al.*, 2002)), no induzca neurodegeneración apoptótica. A la luz del volumen de pruebas biológicamente plausibles relacionadas con la falta de estimulación trófica que produce apoptosis durante el bloqueo del receptor de NMDA (revisado en Haberny *et al.*, 2002), se intenta sugerir que el xenón presenta una propiedad anti-apoptótica nueva, mediada por una diana no definida todavía (que podría ser membranosa, citoplasmática, mitocondrial o nuclear, dadas las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas inusuales del xenón). Aunque al menos en teoría, el bloqueo inusual por el xenón de los receptores de NMDA podría ser responsable (por ejemplo, a través de una subunidad del receptor de NMDA que presenta una distribución o un nivel de expresión diferente en neonatos tal como NR2B o NR2D, o incluso un efecto preferente en receptores de NMDA extra-sinápticos (Hardingham *et al.*, 2002)), la capacidad del xenón para oponerse diametralmente a la neurotoxicidad mediada por el antagonista del receptor de NMDA sugiere que hay otros sistemas implicados (Nagata *et al.*, 2001). Por tanto, es posible que como antagonista del receptor de NMDA, el xenón podría estar induciendo un grado de señalización pro-apoptótica a través de una cascada de señalización intracelular, mientras que la teórica acción anti-apoptótica altera simultáneamente la misma cascada en una posición posterior (y por tanto, bloqueando también la señalización inducida por isoflurano).

#### Utilización de xenón durante la sinaptogénesis: xenón en combinación con isoflurano

En este estudio se demostró que la administración concomitante del 60% de xenón puede inhibir la apoptosis inducida por el 0,75% de isoflurano 4 veces, hasta un nivel no estadísticamente diferente de los controles expuestos a aire. Esto conduce a la hipótesis de que el xenón presenta un efecto antiapoptótico dentro del marco de la apoptosis inducida farmacológicamente.

Una característica bien definida del xenón es su falta de efecto en los receptores de GABA; este atributo es el que puede fundamentar algunos de los efectos atípicos del xenón sobre el SNC. Como consecuencia, es razonablemente seguro descargar cualquier antagonismo directo de la acción del isoflurano en el receptor de GABA. La única posibilidad restante es la alteración posterior de la ruta de apoptosis propuesta inducida por isoflurano u óxido nitroso, o bien mediante xenón directamente, o bien mediante una vía indirecta que implica posiblemente la modulación de otras rutas, por ejemplo la dopaminérgica (Ma *et al.*, 2002).

La comparación entre los datos para el xenón solo y el xenón en combinación con isoflurano sugiere que el xenón puede reducir el grado de lesión neuronal inducida por isoflurano, mientras que presenta un efecto mínimo

sobre el proceso de la muerte celular fisiológica (observado en controles). Esto implica que el xenón puede alterar la señalización pro-apoptótica patológica. Si el xenón fuera a potenciar la ruta de "supervivencia" intrínseca (por ejemplo, mediante regulación por incremento de Bcl-X<sub>L</sub>), entonces sería razonable esperar una reducción en el nivel de PCD en la exposición al 75% de xenón (lo que claramente no es el caso). Sin embargo, esto es altamente especulativo, dada la falta de comprensión en los mecanismos implicados; actualmente no se sabe si las rutas apoptóticas secuestradas por los anestésicos convencionales son idénticas a la PCD de control. Pueden encontrarse respuestas en un análisis en profundidad de las diferentes rutas implicadas en el mecanismo de acción del xenón cuando se compara con el óxido nitroso (un antagonista gaseoso del receptor de NMDA que actualmente es el agente comparable más próximo).

#### Implicaciones clínicas

Dado el precio y los valores de MAC del xenón, es una necesidad económica (incluso con los sistemas de recuperación-reciclaje más avanzados) así como una necesidad clínica que la anestesia con xenón se mantenga con otro agente. El presente trabajo con combinaciones de agentes sugiere que la utilización de isoflurano, aunque induciendo apoptosis neuronal como agente individual, es adecuado para este fin en neonatos.

Experimentos han revelado al xenón como tratamiento potencial para la apoptosis inducida por anestésico. Por tanto, la utilización de xenón en anestesia pediátrica (a dosis económicamente factibles) podría aumentar espectacularmente la seguridad de los protocolos anestésicos generales actuales.

En resumen, estos datos añaden credibilidad a la utilización segura y eficaz del xenón en el neonato; el xenón es actualmente el único anestésico conocido que se ha demostrado que no induce apoptosis neuronal neonatal a dosis clínicamente aplicables. Esto abre la posibilidad de que la anestesia basada en xenón encuentre un campo rentable dentro de la pediatría como agente anestésico seguro, potencialmente analgésico y potencialmente neuroprotector.

#### Combinaciones de xenón/sevoflurano

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una combinación que comprende xenón y sevoflurano. Preferentemente, la combinación es una combinación sinérgica.

Estudios realizados por el solicitante han demostrado que, sorprendentemente, las combinaciones de xenón y sevoflurano a concentraciones en las que son completamente ineficaces como agentes individuales, proporcionan una notable neuroprotección cuando se combinan y se administran a un sujeto antes de una lesión hipóxica, es decir el xenón y el sevoflurano en combinación muestran una protección sinérgica sorprendente e inesperada contra la lesión hipóxica posterior.

Aunque sin querer restringirse a la teoría, se cree que el efecto protector es anti-necrótico, en lugar de anti-apoptótico, es decir el efecto protector surge de la prevención de la muerte celular por necrosis. La muerte celular puede producirse por apoptosis o necrosis. En el primer caso, un estímulo inicia una cascada de acontecimientos que finalmente conducen a muerte celular; la apoptosis a menudo se denomina "muerte celular programada" y forma parte del desarrollo fisiológico normal. En cambio, la necrosis implica un estímulo que induce directamente a la muerte de la célula y siempre es un proceso patológico.

Estudios realizados por el solicitante han demostrado que dosis de xenón y sevoflurano que son ineficaces cuando se administran como agentes individuales funcionan sinérgicamente en combinación, dando como resultado una mayor reducción en la liberación de LDH que concentraciones correspondientes de los gases utilizados solos. Los experimentos han demostrado que ni el 0,67% de sevoflurano, ni el 12,5% de xenón, producen una reducción significativa en la liberación de LDH; por tanto, utilizar xenón o sevoflurano como agentes de preacondicionamiento individuales no ofrece protección significativa del daño isquémico. Sin embargo, cuando los dos gases se utilizan en combinación como agentes de preacondicionamiento, se reduce significativamente la liberación de LDH. Pueden encontrarse detalles adicionales de estos experimentos en los ejemplos adjuntos.

En una forma de realización preferida, el xenón se administra en una cantidad subterapéuticamente eficaz. En este contexto, el término "cantidad subterapéuticamente eficaz" significa una cantidad que es menor que la requerida normalmente para producir anestesia. Generalmente, una atmósfera de aproximadamente el 70% de xenón es suficiente para inducir o mantener la anestesia. Por consiguiente, una cantidad subterapéutica de xenón corresponde a menos de aproximadamente el 70% de xenón.

Asimismo, en una forma de realización preferida, el sevoflurano se administra en una cantidad subterapéuticamente eficaz. En este contexto, el término "cantidad subterapéuticamente eficaz" significa una cantidad que es menor que la requerida normalmente para producir anestesia. En general, una atmósfera de aproximadamente el 2,5% de sevoflurano es suficiente para mantener la anestesia. Por consiguiente, una cantidad subterapéutica de sevoflurano corresponde a menos de aproximadamente el 2,5% de sevoflurano.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende xenón y sevoflurano y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición farmacéutica es una formulación anestésica.

5

En una forma de realización preferida, la formulación comprende desde aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 30% de xenón y desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 5% sevoflurano (v/v), comprendiendo el resto oxígeno o nitrógeno, o una mezcla de los mismos. Más preferentemente, la formulación comprende desde aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 20% de xenón y desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 4% sevoflurano, comprendiendo el resto oxígeno o nitrógeno, o una mezcla de los mismos.

10

En una forma de realización altamente preferida de la invención, la formulación comprende aproximadamente el 12,5% de xenón, aproximadamente el 0,67% de sevoflurano, aproximadamente el 25% de oxígeno y el resto es nitrógeno.

15

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una formulación anestésica para prevenir uno o más déficits neurológicos inducidos por sevoflurano en un sujeto, comprendiendo dicha formulación xenón y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable.

20

Otro aspecto de la invención se refiere a una formulación anestésica para prevenir la neurodegeneración inducida por sevoflurano en un sujeto, comprendiendo dicha formulación xenón y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable.

25

Aún otro aspecto de la invención se refiere a una formulación anestésica para prevenir la apoptosis neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto, comprendiendo dicha formulación xenón y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable.

30

Un aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón y sevoflurano en la preparación de un medicamento para proporcionar neuroprotección y/o anestesia y/o analgesia.

35

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para proporcionar neuroprotección y/o anestesia y/o analgesia, en la que dicho medicamento es para su utilización en combinación con sevoflurano.

40

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de sevoflurano en la preparación de un medicamento para proporcionar neuroprotección y/o anestesia y/o analgesia, en la que dicho medicamento es para su utilización en combinación con xenón.

45

Un aspecto adicional de la invención se refiere a la utilización de (i) xenón, y (ii) sevoflurano, en la preparación de un medicamento para prevenir la lesión neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir uno o más déficits neurológicos inducidos por sevoflurano en un sujeto. Preferentemente, el déficit neurológico está asociado con necrosis neuronal.

50

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la neurodegeneración inducida por sevoflurano en un sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la necrosis neuronal en un sujeto.

55

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la apoptosis neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto.

60

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la lesión neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón y sevoflurano en la preparación de un medicamento para proporcionar anestesia en un sujeto, en la que la cantidad de xenón es suficiente para prevenir la lesión neuronal inducida por sevoflurano.

65

Aún otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la necrosis neuronal, o un estado asociado con necrosis neuronal.

Los estados asociados con necrosis neuronal incluyen, por ejemplo, infarto isquémico e infarto debido a

traumatismo.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de proporcionar neuroprotección y/o anestesia y/o analgesia en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de xenón y sevoflurano.

Preferentemente, el xenón y el sevoflurano se administran antes de la lesión hipóxica-isquémica, más preferentemente, al menos 1 hora, más preferentemente al menos 2 horas antes de la lesión hipóxica-isquémica. En una forma de realización particularmente preferida, el xenón y el sevoflurano se administran desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 24 horas antes de la lesión hipóxica-isquémica.

Preferentemente, el sujeto es un mamífero, más preferentemente, un ser humano.

Para todos los aspectos de la invención, preferentemente el sujeto es un sujeto neonatal.

En una forma de realización preferida, el xenón y el sevoflurano se administran al sujeto neonatal mediante la administración a la madre antes de y/o durante el parto, o antes de y/o durante una cesárea.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de prevención de déficits neurológicos inducidos por sevoflurano en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de prevención de la neurodegeneración inducida por sevoflurano en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de prevención de la apoptosis neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de prevención de la necrosis neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de prevención de la lesión neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.

Aún otro aspecto de la invención se refiere a un método de prevención de la lesión neuronal inducida por sevoflurano en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto xenón y sevoflurano.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de proporcionar anestesia y/o analgesia en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar xenón en combinación con sevoflurano, en el que la cantidad de xenón es suficiente para prevenir la lesión neuronal inducida por sevoflurano.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de prevención de la necrosis neuronal, o un estado asociado con necrosis neuronal, en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de xenón a dicho sujeto.

Aún otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón e isoflurano en la preparación de un medicamento para su utilización como agente de precondicionamiento para proteger contra la lesión hipóxica.

Tal como se usa a lo largo de todo el documento, el término "agente de precondicionamiento" se refiere a un medicamento que puede prevenir el daño neuronal que puede surgir de una lesión hipóxica posterior. Normalmente, los agentes de precondicionamiento pueden administrarse antes de acontecimientos potencialmente perjudiciales tales como cirugía invasiva, derivación cardiopulmonar (CPB), trasplante de órgano, parto, antes de la implantación uterina del embrión fecundado (como parte de la fecundación *in vitro*), procedimientos quirúrgicos neurovasculares, resecciones de tumor cerebral y similares. Los agentes de precondicionamiento también pueden administrarse tras uno o más acontecimientos perjudiciales en los que el sujeto puede estar en riesgo de acontecimientos perjudiciales adicionales posteriores, por ejemplo, pacientes con accidente cerebrovascular.

Preferentemente, cuando se usa como agente de precondicionamiento, el xenón se administra antes de la lesión hipóxica-isquémica, más preferentemente, al menos 1 hora, más preferentemente al menos 2 horas antes de la lesión hipóxica-isquémica. En una forma de realización particularmente preferida, el xenón se administra desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 24 horas antes de la lesión hipóxica-isquémica.

Aún otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para su utilización como agente de preconditionamiento para proteger contra la lesión hipóxica, en la que dicho medicamento es para su utilización en combinación con sevoflurano.

5

Aún otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de sevoflurano en la preparación de un medicamento para su utilización como agente de preconditionamiento para proteger contra la lesión hipóxica, en la que dicho medicamento es para su utilización en combinación con xenón.

10

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de protección de un sujeto de la lesión hipóxica, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de xenón y sevoflurano.

15

La presente invención se describe adicionalmente a modo de ejemplo no limitativo y con referencia a las figuras siguientes, en las que:

20

La figura 1 muestra ratas anestesiadas durante un periodo de 6 h (experimentos de neurodegeneración) o 105 min (prueba de formalina). Una vez extirpados los cerebros, se obtuvieron cortes para incluir la región de interés: un corte frontal a -3,6 mm del bregma (experimentos de neurodegeneración) o un corte transversal de la intumescencia lumbosacra de la médula espinal (prueba de formalina). Figura 1A: Disposición para anestesia con xenón de circuito cerrado. Figura 1B: Diagrama que representa una vista sagital a través del cerebro de rata neonatal, y el corte transversal utilizado para el recuento. Figura 1C: Diagrama, de un corte transversal a través de la intumescencia lumbosacra de la médula espinal de la rata neonatal (las líneas discontinuas representan límites de regiones de recuento, tomadas de un protocolo utilizado previamente (Duckhyun y Barr, 1995).

25

30

La figura 2 muestra cortes teñidos con plata. Se empleó la tinción con plata de DeOlmos para determinar posibles zonas de interés para inmunohistoquímica. Se anestesió a las ratas con diversas combinaciones de gases, se les extirpó el cerebro y se obtuvieron cortes para la tinción de DeOlmos. Las zonas de neurodegeneración no específica se tiñen de negro (ampliación x4). Figura 2A: Fotomicrografía de la corteza de un animal de control, que muestra baja captación de plata. Figura 2B: Fotomicrografía de la corteza de una rata expuesta al 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano, que muestra captación de plata en capas corticales específicas. Figura 2C: Fotomicrografía del hipocampo de un animal de control, que muestra baja captación de plata. Figura 2D: Fotomicrografía del hipocampo de una rata expuesta al 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano, que muestra amplia captación de plata.

35

40

La figura 3 muestra neurodegeneración apoptótica cortical e hipocámpica inducida por exposición a anestésicos en ratas neonatales: datos medios. Neurodegeneración apoptótica inducida en la corteza y el hipocampo mediante anestesia fingida o exposición a anestésicos (el 75% de óxido nitroso, el 75% de xenón, el 0,75% de isoflurano, el 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano o el 75% de xenón + el 0,75% de isoflurano) tal como se mide con inmunotinción con caspasa-3 en la corteza de ratas neonatales de 7 días de edad. Figura 3A: Datos medios de la corteza (media  $\pm$  DE, n = 3) de todos los grupos de tratamiento. \*\* p < 0,01 frente a aire; \*\*\* p < 0,001 frente a aire. Figura 3B: Datos medios del hipocampo (media  $\pm$  DE, n = 3) de todos los grupos de tratamiento. \*\* p < 0,01 frente a aire.

45

50

La figura 4 muestra neurodegeneración apoptótica cortical en ratas neonatales expuestas a agentes anestésicos individuales. Fotomicrografías (ampliación x4) que muestran inmunotinción con caspasa-3 de la corteza, destacando las células destinadas para apoptosis (tinción negra). Las fotomicrografías (ampliación x4) corresponden a exposición a gas: aire (A), el 75% de óxido nitroso (B), el 75% de xenón (C) o el 0,75% de isoflurano (D) durante 6 horas.

55

60

La figura 5 muestra neurodegeneración apoptótica cortical en ratas neonatales expuestas a combinaciones de agentes anestésicos. Fotomicrografías (ampliación x4) que comparan la tinción con caspasa-3 en la corteza de ratas neonatales expuestas a o bien el 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano (A), o bien el 60% de xenón + el 0,75% de isoflurano (B) durante 6 h. Pese al hecho de que tanto el óxido nitroso como el xenón están caracterizados como antagonistas del receptor de NMDA, muestran propiedades diametralmente opuestas cuando modulan la apoptosis inducida por isoflurano (potenciación y atenuación, respectivamente). La microscopía óptica de alta potencia (ampliación x20) confirmó que todas las neuronas se teñían, lo que estaba de acuerdo con que la caspasa-3 es una enzima citoplasmática (C).

65

70

La figura 6 muestra neurodegeneración apoptótica hipocámpica inducida por la exposición a anestésicos en ratas neonatales. Tras una exposición a gas de 6 h, se realizó inmunotinción de caspasa-3 del hipocampo para destacar las células destinadas para la apoptosis (tinción negra). Las fotomicrografías (a ampliación x4) corresponden a exposición a gas: aire (A), el 75% de óxido nitroso (B), el 75% de xenón (C), el 0,75% de isoflurano (D), el 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano (E), y el 60% de xenón + el 0,75% de isoflurano (F).

75

La figura 7 muestra los resultados de la prueba de formalina. Se comparó el potencial analgésico de (el 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano) con (el 60% de xenón + el 0,75% de isoflurano) usando una prueba de formalina para cuantificar la respuesta nociceptiva a una inyección de formalina en la pata trasera izquierda a través de la expresión de c-Fos en la médula espinal. Figura 7A: Datos medios (media  $\pm$  DE, n = 3) de todos los grupos de tratamiento. \*\*\* p < 0,001 frente a controles con inyección de formalina; + p < 0,05 frente a N<sub>2</sub>O + Iso. Figura 7B: Fotomicrografía de corte de médula espinal para el 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano. Figura 7C: Fotomicrografía de corte de médula espinal para el 60% de xenón + el 0,75% de isoflurano.

La figura 8 muestra el diagrama de flujo del protocolo de ensayo de LDH.

La figura 9 muestra el diagrama de flujo del protocolo para evaluar las poblaciones celulares necróticas, viables y apoptóticas tras el preacondicionamiento.

La figura 10 muestra el gráfico de la liberación de LDH frente a la concentración de xenón. Se preacondicionaron las células durante 2 horas seguido por OGD (privación de oxígeno y glucosa).

La figura 11 muestra el gráfico de la liberación de LDH frente a las concentraciones de sevoflurano. Se preacondicionaron las células durante 2 horas seguido por OGD.

La figura 12 muestra el gráfico de liberación de LDH frente al preacondicionamiento con xenón, el preacondicionamiento con sevoflurano y la combinación de preacondicionamientos. Se preacondicionaron las células durante 2 horas seguido por OGD.

La figura 13 muestra el preacondicionamiento de combinación, usando análisis de FACS de poblaciones celulares necróticas, viables y apoptóticas.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

Este estudio se adapta a la ley del R.U. sobre animales (procedimientos científicos) de 1986 y el protocolo del estudio tiene la aprobación del Ministerio del Interior.

#### **Ejemplo 1.**

### Exposición a gases anestésicos

#### Animales

Se colocaron crías de rata Sprague-Dawley de 7 días de edad en pocillos individuales de una cámara de anestesia personalizada y se aleatorizaron a grupos A-F para recibir una de 6 combinaciones de gases durante 6 horas. Un trabajo anterior ha establecido que los antagonistas de receptor de NMDA presentan su máximo efecto neurodegenerativo 7 días tras el nacimiento (Ikonomidou *et al.*, 1999).

### Suministro de gas

El grupo B recibió el 75% de óxido nitroso y el 25% de oxígeno suministrado por una máquina de anestesia calibrada, mientras que el C recibió el 75% de xenón junto con el 25% de oxígeno mediante una máquina de anestesia personalizada modificada para el suministro de xenón (Ohmeda, modificado por Air Products, Surrey, R.U.). El grupo D se expuso al 25% de oxígeno junto con el 0,75% de isoflurano. Los 2 grupos restantes se expusieron a combinaciones de gases, concretamente el 25% de oxígeno + el 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano (grupo E) y el 25% de oxígeno + el 60% de xenón + el 15% nitrógeno + el 0,75% de isoflurano (grupo F). El alto coste de xenón descarta su utilización en un circuito abierto, por consiguiente el grupo C y el grupo F recibieron gases utilizando un sistema de circuito cerrado (figura 1A), mientras que los gases para todos los demás grupos se suministraron en un circuito abierto de alto flujo.

### Monitorización

Todas las ratas se mantuvieron normotérmicas a lo largo de todo el estudio utilizando un baño de agua combinado con un termostato. Se monitorizaron las concentraciones de gases con un módulo de espirometría S/5 (Datex-Ohmeda, Bradford, R.U.) y se comprobaron regularmente las propias ratas para detectar signos de dificultad respiratoria. Dadas las características químicas inertes del xenón gaseoso, se utilizó un monitor 439XE especial (Air Products, Surrey, R.U.) para verificar el suministro de concentraciones anestésicas de xenón, basándose en análisis de radiofrecuencia.

Perfusión tisular. Recogida y fijación

Se sacrificaron ratas destinadas para inmunohistoquímica con 100 mg kg<sup>-1</sup> de pentobarbital sódico i.p. inmediatamente tras la anestesia, mientras que se permitió que las ratas para tinción con plata de DeOlmos se recuperaran durante 18 h antes de someterse al mismo procedimiento. Se realizó una toracotomía y se insertó una cánula en la aorta a través de una aguja insertada en la punta del corazón. Después se sometió la cría a perfusión con 10 ml de disolución de heparina al 1%, saliendo el exceso de disolución a través de una incisión en la aurícula derecha. Para fijar los tejidos, se inyectaron 20 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M mediante la misma vía transcardíaca. Después se extirpó el cerebro completo y se dejó fijar en perfundido de paraformaldehído y se refrigeró a 4°C. 24 horas después, se transfirieron los cerebros a una disolución de sacarosa al 30% con tampón fosfato y azida de sodio al 1%, y se mantuvieron refrigerados hasta que se hundieron los cerebros (aproximadamente 48 horas).

Seccionamiento

Una vez procesados, se cortó un bloque para incluir de manera segura el área de interés, una sección coronal a -3,6 mm del bregma (figura 1B). Después se incrustaron los bloques y se congelaron en disolución de O.C.T. Después se cortó el bloque de manera coronaria en aproximadamente 120 cortes, cada uno de 30 µm de grosor, con un criostato (Bright Instrument Company Ltd., Huntingdon, R.U.). Se transfirieron las secciones cortadas a una placa de 6 pocillos que contenían solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Protocolos de tinciónTinción con plata de DeOlmos

Se llevó a cabo la tinción con plata de DeOlmos según un protocolo establecido (DeOlmos e Ingram, 1971). Se montaron las secciones flotantes sobre portaobjetos Polysine adhesivos, se lavaron en agua destilada y después se incubaron en una mezcla de cobre-plata (1000 ml de nitrato de plata al 2,5%, 15 ml de nitrato cúprico al 0,5%, 40 ml de piridina y 80 ml de alcohol etílico al 95%). Tras 4 días se retiraron las secciones, se trataron con acetona al 100% durante 5 min y después se transfirieron a disolución madre de nitrato de plata amoniacal recién preparada (300 ml de agua destilada, 200 ml de NaOH al 0,36%, 90 ml de hidróxido de amonio concentrado y 10 ml de nitrato de plata al 20%) durante 15 min. Inmediatamente tras el nitrato de plata amoniacal se colocaron los portaobjetos en una disolución reductora compuesta por 24 ml de formalina no neutralizada al 10%, 14 ml de ácido cítrico al 1%, 200 ml de etanol al 100% y 1762 ml de agua destilada durante 2 min. Para completar el procesamiento, se tiñeron los fondos de las secciones de amarillo con ferrocianuro de potasio al 0,5%, se blanquearon durante 1 min en tiosulfato de sodio al 1% y después se lavaron en agua destilada. Después se deshidrataron suavemente en etanol al 70%, al 90% y al 100%. Después se eliminó el etanol con dos exposiciones de 5 min a xileno al 100%. Mientras todavía estaban húmedos con xileno, se añadieron a los portaobjetos 2 gotas de medios de cubreobjetos Styrolite (BDH, Poole, R.U.) y después se cubrieron con cubreobjetos. Habiendo eliminado las burbujas de aire mediante golpeteos, se dejaron secar los portaobjetos durante la noche antes de la microscopía óptica.

Inmunohistoquímica de caspasa-3

Se transfirió un pocillo aleatorio de cada bloque cortado, que contenían cada uno aproximadamente 20 cortes representativos del bloque total, a un pocillo de fondo de seda marcado utilizando una pipeta Pasteur de 3 ml. Después se lavaron las secciones en 5 ml de PBS durante 5 min en un agitador ajustado a 75 rpm. Se repitió este procedimiento de lavado dos veces más, sustituyendo el PBS cada vez. Para extinguir las secciones, se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 30 min en una disolución que comprendía 35 ml de metanol, 15 ml de PBS y 500 µl de disolución madre de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

Después se retiró la disolución de extinción y se lavaron las secciones tres veces en PBS. Se bloquearon las secciones durante 60 min a temperatura ambiente con 50 ml de PBST (PBS que contenía Triton-X al 0,5% (Promega Corporation, Madison, WI)) y 1500 µl de suero de cabra normal (NGS) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Para la incubación con el anticuerpo primario, se mantuvieron las secciones durante la noche a 4°C en un agitador ajustado a 50 rpm en una disolución compuesta por 16 µl (1:1500) de anticuerpo de conejo anti-caspasa-3 escindida (New England Biolabs, Hertfordshire, R.U.), 50 ml de PBST y 500 µl de NGS. Al día siguiente se lavaron las secciones 3 veces en PBST y después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 60 min en una disolución compuesta por 50 ml de PBST, 750 µl de NGS y 250 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (Chemicon International, Temecula, CA). Tras 3 lavados adicionales en PBST, se incubaron las secciones en disolución ABC recién preparada a partir de un kit Vectastain ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) durante 60 min. Después se eliminó la disolución ABC mediante lavado con 3 cambios de PBS, mientras se preparaba disolución reciente de 3,3'-diamino-bencidina (DAB), que incluía agua destilada, tampón, disolución madre de DAB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y disolución de níquel a partir de un kit de sustrato de peroxidasa (Vector

Laboratories Inc. Burlingame, CA). Se sumergieron los cortes en disolución de DAB durante 4 min a temperatura ambiente, se lavaron inmediatamente 3 veces con PBS para terminar la tinción y después se lavaron 3 veces con agua destilada.

5 Para montar las secciones sobre los portaobjetos de microscopio, se hizo flotar el contenido de los pocillos en agua destilada y se transfirieron las secciones individuales a portaobjetos Superfrost utilizando un pincel fino. Una vez montados, se dejaron secar los portaobjetos durante la noche. Para completar el procesamiento de los portaobjetos, después se deshidrataron los portaobjetos con muestras, se limpiaron y se cubrieron con cubreobjetos tal como para la tinción con plata de DeOlmos.

10 Inmunohistoquímica de c-Fos

15 Se realizó la inmunohistoquímica de c-Fos en paralelo con la inmunohistoquímica de caspasa-3 con tan sólo tres cambios al protocolo. Mientras que se utilizó NGS en el protocolo de caspasa-3, se utilizó suero de asno normal (NDS) (Chemicon International, Temecula, CA) para los pocillos de c-Fos. El anticuerpo primario utilizado fue 20 µl (1:2500) de anticuerpo de cabra anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), y el anticuerpo secundario fue 250 µl de anticuerpo de asno anti-cabra (Chemicon International, Temecula, CA). Todas las demás etapas de inmunotinción de c-Fos fueron idénticas a las del protocolo de inmunohistoquímica de caspasa-3.

20 Cuantificación

25 Se determinó el número de neuronas en degeneración o activadas contando el número de células teñidas con DAB (negras) en una sección coronal de un hemisferio alrededor de -3,6 mm desde el bregma visualizada con un microscopio óptico BX-60 (Olympus, Southall, R.U.) y se tomaron fotomicrografías de ejemplo con una cámara digital Axiocam (Zeiss, Göttingen, Alemania). Se recopilaron datos tanto de la corteza como del hipocampo a lo largo de 3 cortes, tras lo cual se calculó el número medio de neuronas en degeneración. Las secciones teñidas con el método de tinción con plata se fotografiaron bajo el microscopio sin ningún recuento formal.

30 Análisis de datos

35 Todos los datos se expresan como media ± desviación estándar. El análisis estadístico comprendía un análisis de varianza de medidas repetidas paramétricas de medias seguido por una prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples a lo largo de los grupos A-F. Se consideró que un valor de P de < 0,05 era estadísticamente significativo.

Pruebas de formalina

40 Se llevaron a cabo pruebas de formalina según un protocolo establecido (Ma *et al.*, 2004) para comparar el grupo E con el grupo F. Se aleatorizaron ratas de una camada a uno de 4 grupos para recibir diferentes inyecciones y gases: aire + formalina, aire + solución salina, el 60% de xenón + el 0,75% de isoflurano + formalina o el 75% de óxido nitroso + el 0,75% de isoflurano + formalina. Se expusieron todas las ratas a la mezcla de gases respectiva durante 15 min y después se les inyectó en la pata trasera izquierda o bien formalina (10 µl de formalina al 5%) o bien un volumen equivalente de solución salina. Tras 90 min adicionales de exposición a gas, se sacrificaron los animales/muestras de médula espinal, se sometieron a perfusión y se fijaron como en el estudio principal. De toda la médula espinal, se cortó un bloque, que comprendía la intumescencia lumbosacra. Se cortaron secciones transversales de 30 µm en un criostato y se procesaron las secciones para determinar la inmunohistoquímica de c-Fos. Tras la tinción, se seleccionaron 3 secciones que mostraban una expresión máxima de c-Fos y se tomaron fotografías de cada grupo, y se dividió la médula espinal en regiones tal como se notificó anteriormente (figura 1C) (Duckhuan y Barr, 1995). Después se calculó el número medio de células positivas para c-Fos por región para el análisis estadístico.

Resultados

55 Tinción con plata de DeOlmos

60 Como marcador no específico de regiones que experimentan neurodegeneración, la tinción con plata de DeOlmos destacó particularmente tanto el hipocampo como capas corticales específicas. Estas áreas mostraron una extensa captación de plata, indicada por tinción negra en secciones expuestas a anestésicos, en contraposición a controles sometidos a anestesia simulada en los que la captación fue mínima (figura 2).

Inmunohistoquímica de caspasa-3Caspasa-3 activada cortical

5 Las células neuronales que mostraban activación de caspasa-3 eran fácilmente distinguibles del fondo como tinción de axones y cuerpos celulares negra. La tinción estableció el nivel de nivel de fondo de la activación de caspasa-3 cortical en ratas expuestas a aire como de  $19,3 \pm 6,4$  (media  $\pm$  DE),  $n = 4$  (figura 3A). Como agentes individuales, ni el 75% de N<sub>2</sub>O ni el 75% de xenón inducen un aumento significativo de las células positivas para caspasa-3 ( $22,5 \pm 5,9$ ,  $n = 3$  y  $19,7 \pm 9,6$ ,  $n = 3$  respectivamente;  $p > 0,05$  frente al aire) mientras que la administración del 0,75% de isoflurano solo produjo un nivel moderado de tinción de caspasa-3 activada ( $76,5 \pm 11,4$ ,  $n = 5$ ;  $p < 0,01$  frente al aire) (figura 4).

10 En combinación con el 0,75% de isoflurano, el 75% de N<sub>2</sub>O potencia considerablemente la apoptosis inducida por isoflurano ( $232,0 \pm 19,9$ ,  $n = 6$ ;  $p < 0,001$  frente al aire) mientras que el 60% de xenón reduce la lesión ( $26,7 \pm 3,9$ ,  $n = 4$ ;  $p > 0,05$  frente al aire) (figura 5).

Caspasa-3 activada en hipocampo

20 Ni el 75% de N<sub>2</sub>O ni el 75% de xenón mostraron un aumento significativo de las células positivas para caspasa-3 por encima del nivel inicial ( $3,7 \pm 1,4$  y  $5,0 \pm 3,2$  respectivamente frente a  $5,2 \pm 1,8$  en los controles;  $p > 0,05$ ) (figura 3B). En cambio, el 0,75% de isoflurano solo aumenta significativamente el número de neuronas en degeneración ( $22,1 \pm 9,6$ ;  $p < 0,01$  frente al aire), al igual que lo hizo la combinación del 0,75% de isoflurano y el 75% de N<sub>2</sub>O ( $34,8 \pm 20,2$ ;  $p < 0,01$  frente al aire) (figura 6). La administración doble del 60% de xenón con el 0,75% de isoflurano redujo el grado de lesión neuronal hasta  $5,8 \pm 2,6$ ;  $p = < 0,05$  frente al aire.

Expresión de c-Fos en médula espinal (prueba de formalina)

30 Ambas combinaciones de gases (el 75% de N<sub>2</sub>O + el 0,75% de isoflurano y el 60% de xenón + el 0,75% de isoflurano) mostraron un efecto analgésico suprimiendo la expresión de c-Fos en todas las regiones de la médula espinal frente a controles positivos a los que se les inyectó formalina ( $p < 0,001$ ) (figura 7). En las láminas A/B, en las que la expresión de c-Fos era máxima, la combinación con xenón confirió un mayor efecto analgésico que el inducido por la combinación nitrosa ( $15,0 \pm 1,7$  frente a  $22,3 \pm 4,3$  respectivamente;  $p < 0,05$ ).

**Ejemplo 2**

35

MétodosCultivo conjunto neuronal glial

40 Se obtuvieron neocortezas cerebrales completas (carentes del hipocampo, ganglios basales y meninges) a partir de crías poco después del nacimiento (1-2 días de edad) de ratones BALB/c. Se anestesiaron las crías con isoflurano y después se decapitaron colocando las cabezas inmediatamente en disolución de HSG a 4°C, una disolución con alto contenido en glucosa y sacarosa, isotónica, compuesta principalmente por solución salina equilibrada de Hank (HBSS, GibroBRL) potenciada con NaHCO<sub>3</sub> (0,04 M), sacarosa (0,2 M) y D-glucosa (0,3 M) que también contenía disolución de antibiótico – antimicótico (AAS, GibroBRL). A lo largo de todo el procedimiento de microdissección, se mantuvieron los tejidos cerebrales en disolución de HSG a 4°C.

50 Después se sumergió el tejido cerebral en tripsina al 0,25% y se colocó en una cámara de aire con agitación durante 50 minutos a 37°C rellena con el 5% de CO<sub>2</sub> y el 95% de aire ambiental. Después se añadió ADNasa a la mezcla y se colocó de nuevo en la cámara de aire con agitación durante 15 minutos adicionales. Después se centrifugó la mezcla a 1600 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Después se resuspendieron las células y después se sembraron en placa a una densidad de  $6,25 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos múltiples (Costar, Cambridge, MA) y se cultivaron en un medio que consistía en medio esencial mínimo de Eagle aumentado con glucosa 20 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, suero bovino fetal al 10%, suero de caballo inactivado por calor al 10%, AAS (Gibco, Paisley, R.U.), glutamina 2 mM (Sigma, Poole, R.U.) y factor de crecimiento epidérmico murino (EGF) 10 ng/ml (Gibco-BRL). Las células gliales alcanzaron la confluencia aproximadamente una semana tras la siembra en placa.

60 Utilizando un procedimiento similar se obtuvieron células neuronales corticales a partir de ratones BALB/c fetales a los 14-16 días de gestación y se sembraron en placa a una densidad de  $1,25 \times 10^5$  células por cm<sup>2</sup> en la monocapa confluyente de células gliales derivadas de la estirpe genética correspondiente. Las células neuronales alcanzaron la confluencia 10 días tras la siembra en placa.

Cultivo neuronal puro

Se recogieron células neuronales a partir de ratones embrionarios de 19 días de edad mediante cesárea para ratones BALB/c preñados. Se extirparon 6-9 cerebros de ratón a partir de ratones fetales y se disecaron para aislar neocórtex cerebrales completas carentes del hipocampo, ganglios basales y meninges. De nuevo a lo largo de todo el procedimiento de microdissección, se mantuvieron los tejidos cerebrales en disolución de HSG a 4°C. A partir de aquí, se realizó un procedimiento de siembra en placa similar descrito anteriormente. Se sembraron las células a una densidad de  $1,2 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$  en placas de 24 pocillos múltiples (Cater, Cambridge, MA) y se mantuvieron los cultivos a 37°C en un entorno humidificado con el 5% de  $\text{CO}_2$ . Se utilizaron medios neurobasales suplementados con B27, glutamina y AAS para resuspender las células neuronales y como medio de cultivo. Por cada 10 ml de medios neurobasales, se añadieron los siguientes suplementos: 200  $\mu\text{l}$  de B27, 100  $\mu\text{l}$  de antibiótico y 25  $\mu\text{l}$  de glutamina. Se realizó la sustitución de medio para estas células el día 2, 5 y 7 con medio de cultivo previamente calentado a 37°C (medios neurobasales, B27, glutamina y AAS). El día 5 tras la siembra en placa neuronal, se añadió arabinósido de citosina 10  $\mu\text{l}/10$  ml (clorhidrato de CA, Sigma) a los cultivos celulares para detener la división de células no neuronales. Los cultivos de células neuronales estaban listos para utilizar el día 7.

Preacondicionamiento

Se preacondicionaron las células utilizando cámaras de gas de temperatura controlada, herméticas, de 1,4 litros, especialmente construidas. Las cámaras presentaban válvulas de entrada y de salida y un ventilador eléctrico interno para garantizar un suministro eficaz y continuo de gases. La velocidad de flujo de gas era de 100 ml/min, y por tanto se purgaron las cámaras y se dejó que se equilibraran durante 45 minutos antes de establecer un sistema cerrado. Se preacondicionaron las células durante 2 horas dentro del sistema cerrado con las concentraciones de gases apropiadas utilizando caudalímetros. Se suministró sevoflurano utilizando un vaporizador (Datex-Ohmeda).

Preparación de disoluciones impregnadas con gas – Se preparó solución salina equilibrada desoxigenada (BSS) burbujeando el 5% de  $\text{CO}_2$  y el 95% de  $\text{N}_2$  a través de burbujeadores de gas sinterizado al interior de la BSS en un frasco de Drechsel en un incubador a 37°C.

Privación de oxígeno y glucosa

Para modelar el daño isquémico en el cerebro, se sometieron células neuronales a privación de oxígeno y glucosa. Veinticuatro horas tras preacondicionar las células, se lavaron los cultivos dos veces con disolución de tampón HEPES (NaCl 120 mM, KCl 5,4 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,8 mM, glucosa 15 mM y HEPES 20 mM, titulado a pH 7,4 utilizando NaOH 1 M). Después se lavaron una vez con BSS desoxigenada previamente calentada sin glucosa (NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,8 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,8 mM,  $\text{NaHCO}_3$  26 mM) y después se titularon a un pH de 7,4 utilizando HCl 2 M. Después se sustituyó el medio de cultivo con 600  $\mu\text{l}$  de BSS desoxigenada y después se colocó inmediatamente en una cámara de exposición a gas hermética a 37°C y se dejó equilibrar hasta un entorno anaerobio que consistía en el 5% de  $\text{CO}_2$  y el 95% de  $\text{N}_2$ . Se expusieron las células a este entorno anóxico durante 75 minutos. Se terminó la privación de oxígeno y glucosa retirando los cultivos de la cámara de gas y cambiando los medios; los cultivos destinados al ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) se lavaron una vez y se sustituyeron con medio esencial mínimo de Eagle potenciado con glucosa 25 mM y  $\text{NaHCO}_3$  38 mM, mientras que los cultivos neuronal puros para FACS se lavaron una vez y se sustituyeron con medios neurobasales suplementados con B27, glutamina y AAS.

Medición de LDH

Se evaluó la cantidad de daño neuronal mediante la cantidad de LDH liberada al interior del medio de cultivo, utilizando un kit enzimático colorimétrico normalizado (Sigma, Poole R.U.). Esta técnica se ha descrito anteriormente (Wilhelm *et al* 2002). Se realizó la evaluación de LDH 16 horas tras la privación de oxígeno y glucosa (figura 8).

Evaluación de FACS

Veinticuatro horas tras la privación de oxígeno y glucosa se tiñeron las células para el análisis de FACS. Se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con disolución de tampón HEPES. Después se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de 1x disolución de tampón de unión (BB) (HEPES 50 mM, NaCl 750 mM,  $\text{CaCl}_2$  12,5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, BSA al 20%) con anexina V 0,4  $\mu\text{l}/\text{ml}$  (Sigma-Aldrich, Poole, R.U.) y se dejó incubar sobre hielo durante 10 minutos. Después se lavaron las células dos veces con 1x BB, y después se añadió yoduro de propidio 0,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma-Aldrich, Poole, R.U.) en suero bovino fetal al 1% (FBS) en disolución de tampón fosfato (PBS) y se dejó incubar sobre hielo durante 5 minutos. A esto le siguió lavado dos veces con FBS al 1% en PBS y después adición de 400  $\mu\text{l}$  de tripsina al 0,25%/EDTA y se dejó incubar durante 5 minutos a 37°C. Después se añadieron 800  $\mu\text{l}$  de FBS al 1% en PBS para detener la reacción, se retiraron las células y se añadieron a tubos para centrifugación a 1200 g

durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 300  $\mu$ l de FBS al 1% en PBS. Si era posible, se realizaron las etapas sobre hielo para reducir la cantidad de muerte neuronal.

5 Se utilizó un dispositivo FACSCalibur (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) con un único láser de argón para el análisis de citometría de flujo. Se llevó a cabo la excitación a 488 nm y se utilizaron filtros de emisión 515-545 BP (verde; FITC) y 600LP (rojo; PI). Se analizaron al menos 10.000 células por muestra. Se realizó la adquisición de datos con Cell Quest 3.3 (Becton Dickinson) y se realizó el análisis de datos con Cell Quest Pro (Becton Dickinson) (figura 9).

#### 10 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico utilizando Instat. Se expresaron los datos como media  $\pm$  EEM. Se realizó el análisis estadístico de los datos dentro de, y entre, grupos con análisis de varianza para medidas repetidas seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls. Se considera que los resultados son significativos si  $P < 0,05$ .

#### 15 Resultados

##### Preacondicionamiento con xenón

20 El preacondicionamiento con xenón durante 2 horas produce una reducción dependiente de la concentración de la liberación de LDH tras la privación de oxígeno y glucosa (figura 10). La liberación de LDH se redujo significativamente mediante xenón al 50% y al 75%, hasta el 55 $\pm$ 12% y hasta el 49 $\pm$ 12% de los valores de control respectivamente ( $p < 0,05$ ). Xenón al 12,5% redujo la liberación de LDH hasta el 83 $\pm$ 7% y xenón al 25% redujo la liberación de LDH hasta el 70 $\pm$ 11% de los controles. Xenón al 12,5% y al 25% presentó una tendencia a reducir la liberación de LDH con concentraciones crecientes, sin embargo los resultados no fueron significativos ( $p > 0,05$ ).

##### Preacondicionamiento con sevoflurano

30 El preacondicionamiento con sevoflurano durante 2 horas también produce una reducción dependiente de la concentración de la liberación de LDH (figura 11). Concentraciones de sevoflurano superiores al 1,9% produjeron una reducción significativa de la liberación de LDH. Concentraciones de sevoflurano inferiores al 1,9% no redujeron significativamente la liberación de LDH y por tanto no ofrecieron a las células neuronales ninguna protección frente a la privación de oxígeno y glucosa ( $p > 0,05$ ). Sevoflurano al 2,7% dio como resultado una disminución significativa de LDH hasta el 64 $\pm$ 6% del control ( $p < 0,05$ ). La liberación de LDH presentó una reducción máxima a concentraciones de sevoflurano al 3,3% hasta el 37 $\pm$ 5% de los controles ( $p < 0,001$ ). Se encontró que sevoflurano al 0,67% no era eficaz, produciendo una reducción de la liberación de LDH hasta el 97 $\pm$ 5% de los controles, y sevoflurano al 1,3% tampoco produjo ninguna reducción de la liberación de LDH (100 $\pm$ 11% de los controles).

##### Preacondicionamiento con combinación de xenón y sevoflurano

45 Dosis ineficaces de xenón y sevoflurano en combinación funcionaron de manera sinérgica en conjunto dando como resultado una reducción mayor de la liberación de LDH que las concentraciones correspondientes de los gases utilizados por sí solos. En experimentos iniciales (figura 12) los datos mostraron que se encontró que sevoflurano al 0,67% y xenón al 12,5% no producían una reducción significativa de la liberación de LDH, y por tanto no ofrecían ninguna protección significativa frente al daño isquémico ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, cuando se utilizan los dos gases en combinación como agentes de preacondicionamiento, se redujo significativamente la liberación de LDH hasta el 59 $\pm$ 5% de los controles ( $p < 0,001$ ).

##### Evaluación de poblaciones celulares necróticas, viables y apoptóticas con preacondicionamiento con combinación

55 Para extrapolar los mecanismos detrás del preacondicionamiento con xenón, sevoflurano y combinación, se utilizó FACS para determinar si los gases ejercen sus efectos mediante un mecanismo antiapoptótico o antinecrotico. Para esta técnica es necesario utilizar cultivos neuronales puros.

60 Los controles fueron células no teñidas sin lesión y sin preacondicionamiento, con el fin de determinar si las células viables producían fluorescencia y definir una región de células viables. La eficacia de la combinación de xenón y sevoflurano utilizados como agentes de preacondicionamiento para reducir la cantidad de lesión neuronal tras la privación de oxígeno y glucosa concuerda con datos del ensayo de LDH (figura 13). El preacondicionamiento simulado (células lesionadas sin preacondicionamiento), el 12,5% de xenón y el 0,67% de sevoflurano tuvieron una población de células viables significativamente menor en comparación con los controles ( $p < 0,001$ ). El preacondicionamiento con combinación tuvo una población de células viables del 23 $\pm$ 1%, confirmando la sinergia de los dos gases en la reducción de la cantidad de lesión neuronal en un modelo de privación de oxígeno y glucosa en comparación con el 9% en el 12,5% de xenón y el 0,67% de sevoflurano

( $P < 0,001$ ).

Los grupos de control tenían una población necrótica del 17+/-1%, mientras que el precondicionamiento simulado, el precondicionamiento con el 12,5% de xenón y el precondicionamiento con el 0,67% de sevoflurano tenían poblaciones necróticas del 70+/-2%, 75+/-2% y 81+/- 2% respectivamente. Sin embargo, xenón y sevoflurano en combinación tenían una población apoptótica superior del 35%+/-3%, en comparación con xenón solo y sevoflurano solo, con poblaciones apoptóticas del 9+/-1% ( $p < 0,001$ ) y el 17+/-1% ( $p < 0,001$ ) respectivamente.

Una combinación de xenón y sevoflurano tenía una población de células necróticas significativamente reducida del 41+/-2% ( $p < 0,001$ ). Estos datos sugieren que xenón y sevoflurano, cuando se utilizan en combinación como agentes de precondicionamiento, proporcionan una neuroprotección sustancial mediante un mecanismo antinecrótico.

## 15 Bibliografía

Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 22(3):425-44.

Amos RJ, Amess JA, Hinds CJ, Mollin DL (1982) Incidence and pathogenesis of acute megaloblastic bone-marrow change in patients receiving intensive care. *Lancet* 16; 2(8303):835-8

Anand KJ, Scalzo FM (2000) Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behaviour? *Biol. Neonate* 77(2):69-82

Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M (2000) Long-lasting behavioural alterations following a hypoxic/ischaemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research* 859:318-325

Beas-Zárate C, Rivera-Huizar SV, Martínez-Contreras A, Feria-Velasco A, Armendariz-Borunda J (2001) Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. *Neurochemistry International* 39:1-10

Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999) Glutamate Acting at NMDA Receptors Stimulates Embryonic Cortical Neuronal Migration. *The Journal of Neuroscience* 19(11):4449-44461

Behar TN, Smith SV, Kennedy RT, McKenzie JM, Maric I, Barker JL (2001) GABAB Receptors Mediate Motility Signals for Migrating Embryonic Cortical Cells. *Cerebral Cortex* 11:744-753

Beltramino CA, de Olmos JS, Gallyas F, Heimer L, Zaborszky L (1993) Silver staining as a tool for neurotoxic assessment. *NIDA Res Monogr.* 136:101-26

Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA (2002) Constitutive Nuclear Factor- $\kappa$ B Activity Is Required for Central Neuron Survival. *Journal of Neuroscience* 22(19):8466-8475

Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, Dzierko M, Pesditschek S, Mai I, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C (2002) Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *PNAS* 99(23):15089-15094

Brenneman DE, Forsythe ID, Nicol T, Nelson PG (1990) N-methyl-D-aspartate receptors influence neuronal survival in developing spinal cord cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 51(1):63-8

Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription- dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signalling pathway. *Current Opinion in Neurobiology* 11:297-305

Butler AB (1999) Whence and whither cortex? *TINS* 22(8):332-334

Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating Developmental Time Across Mammalian Species. *Neuroscience* 105:7-17

Cullen SC, Gross EG (1951) The Anesthetic Properties of Xenon in Animals and Human Beings, with Additional Observations on Krypton. *Science* 113:580-582

Danysz W, Parsons CG (1998) Glycine and N-Methyl- D-Aspartate Receptors: Physiological Significance and Possible Therapeutic Applications. *Pharmacological Reviews* 50(4):597-664

- Davis KM, Wu JY (2001) Role of glutamatergic and GABAergic systems in alcoholism. *J Biomed Sci* 8(1):7-19
- De Sousa SLM, Dickinson R, Lieb WR, Franks NP (2000) Contrasting Synaptic Actions of the Inhalational General Anesthetics Isoflurane and Xenon. *Anesthesiology* 92:1055-66
- 5 DeOlmos JS, Ingram WR (1971) An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration. *Brain Res* 33:523-529
- 10 Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J, Qin YQ, Ikonomidous C, Olney JW (2001) Apoptosis in the in vivo Mammalian Forebrain. *Neurobiology of Disease* 8:359-379
- Dingledine R y McBain CJ (1999) Glutamate & Aspartate en: Siegel SJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (Eds) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular & Medical Aspects*, 6ª edición, Lippincott-Raven, págs. 315-332
- 15 Dingley J, Ivanova-Stoilova TM, Grundler S, Wall T (1999) Xenon: recent developments. *Anesthesia* 54:335-346
- Dobbing J, Sands J (1979) The brain growth spurt in various mammalian species. *Early Hum Dev* 3:79- 84.
- 20 Dragunow M, Preston K (1995) The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death. *Brain Research Reviews* 21:1-28
- Duckyun KY y Barr GA (1995) The induction of Fos-like immunoreactivity by noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in the lumbar spinal cord of infant rats. *Pain* 60:257-265
- 25 Farber NB, Olney JW (2003) Drugs of abuse that cause developing neurons to commit suicide. *Developmental Brain Research* 147:37-45
- 30 Farber NB, Wozniak DF, Price MT, Labruyere J, Huss J, St. Peter H, Olney JW (1995) Age-Specific Neurotoxicity in the Rat Associated with NMDA Receptor Blockade: Potential Relevance to Schizophrenia? *Biol. Psychiatry* 38:788-796
- 35 Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheung M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13(2):325-38
- Frankiewicz T, Pile A, Parsons CG (2000) Differential effects of NMDA-receptor antagonists on longterm potentiation and hypoxic/hypoglycaemic excitotoxicity in hippocampal slices. *Neuropharmacology* 39:631-642
- 40 Franks NP, Dickinson R, de Sousa SLM, Hall AC, Lieb WR (1998) How does xenon produce anesthesia? *Nature* Vol 396:324
- 45 Frietsch T, Bogdanski R, Blobner M, Werner C, Kuschinsky W, Waschke KF (2001) Effects of Xenon on Cerebral Blood Flow and Cerebral Glucose Utilization in Rats. *Anesthesiology* 94:290-7
- Fukura H, Kitani Y, Komiya Y, Igarashi M (2000) Nitrous Oxide, but not Xenon, Affects the Signalling in the Neuronal Growth Cone. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 24:1357-1368
- 50 Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC (1992) Prevention of programmed cell death of sympathetic neurones by the bcl-2 protooncogene. *Science* 258(5080):302-4
- Goen T, Kadish I, Wyss JM (2002) The role of the laterodorsal nucleus of the thalamus in spatial learning and memory in the rat. *Behavioural Brain Research* 136:329-337
- 55 Goto T, Yoshinori N, Morita S (2003) Will Xenon Be a Stranger of a Friend? *Anesthesiology* 98:1-2
- Green DR (2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102:1-4
- 60 Gyulai FE, Mintun MA, Firestone LL (2001) Dose-dependent Enhancement of In vivo GABAA-Benzodiazepine Receptor Binding by Isoflurane. *Anesthesiology* 95:585-93
- Haberny K, Paule MG, Scallet AC, Sistare FD, Lester DS, Hanig JP, Slikker W (2002) Ontogeny of the NMethyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor System and Susceptibility to Neurotoxicity. *Toxicological Sciences* 68:9-17
- 65 Hanne Marx T, Musati S, Santo M, Suwa K, Morita S (2001) Xenon: Uptake & Costs. *International Anesthesiology Clinics* 3:43-61

- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in Neurosciences* 26(2): 81-89
- 5 Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shutoff and cell death pathways. *Nature Neuroscience* 5(5):405-414
- Hasegawa K, Litt L, Espanol MT, Sharp FR, Chan PH (1998) Expression of c-fos and hsp70 mRNA in neonatal rat cerebrocortical slices during NMDA-induced necrosis and apoptosis. *Brain Research* 785:262-278
- 10 Homi, H.M., Yokoo, N., Ma, D., Warner, D.S., Franks, N.P., Maze, M. & Grocott, H.P. (2003). The neuroprotective effect of xenon administration during transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Anesthesiology* 99, 876-81.
- 15 Hua JY y Smith SJ (2004) Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nature Neuroscience* 7(4):327-332
- Huber JD, Darling SF, Park KK, Soliman KFA (2001) The role of NMDA receptors in neonatal cocaine-induced neurotoxicity. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 69:451-459
- 20 Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovskva V, Hörster F, Tenkova T, Dikranian, Olney JW (2000) Ethanol-Induced Apoptotic Neurodegeneration and Fetal Alcohol Syndrome. *Science* 287:1056-1060
- 25 Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2001) Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochemical Pharmacology* 62:401-405
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, tenkova TI, Stefovskva V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA Receptors and Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain. *Science* 238:70-74
- 30 Ikonomidou C, Lechoslaw T (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurology* 1:383-386
- 35 Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Yukitoshi I, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW, Wozniak DF (2003) Early Exposure to Common Anesthetic Agents Causes Widespread Neurodegeneration in the Developing Rat Brain and Persistent Learning Defects. *The Journal of Neuroscience* 23(3):876-882
- Jevtovic-Todorovic V, Olney JW (2003) Neuroprotective Agents in: Evers AS, Maze M (Eds), *Anesthetic Pharmacology: Physiological Principles & Clinical Practise*, Churchill Livingstone págs. 557-572
- 40 Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM, Mennerick S, Powell S, Dikranian K, Benshoff N, Zorumski CF, Olney JW (1998) Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin. *Nat Med* 4(4):460-3
- 45 Kato K, Li ST, Zorumski CF (1999) Modulation of Long Term Potentiation Induction In The Hippocampus By N-Methyl-D-Aspartate-Mediated Presynaptic Inhibition. *Neuroscience* 92(4):1261-1272
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57
- 50 Komuro H, Rakie P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260(5104):95-7
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weller S, Oh KJ, Schlesinger PH (2002) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAC into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death and Differentiation* 7:1166-1173
- 55 Kubo T, Yokoi T, Hagiwara Y, Fukumori R, Goshima Y, Misu Y (2001) Characteristics of protective effects on NMDA antagonist and calcium channel antagonist on ischemic calcium accumulation in rat hippocampal CA1 region. *Brain Research Bulletin* 54(4):413-419
- 60 Lane GA, Nahrwold ML, Tait AR, Taylor-Busch M, Cohen PJ, Beaudoin AR (1980) Anesthetics as teratogens: N2O is fetotoxic, xenon is not. *Science* 210(4472):899-901
- Layzer RB (1978) Myeloneuropathy after prolonged exposure to nitrous oxide. *Lancet* 9; 2(8108):1227-30
- 65 Li Y, Erzurumlu RS, Chen C, Jhaveri S, Tonegawa S (1994) Whisker-related neuronal patterns fail to develop in

the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell* 76(3):427-37

Lipsky RH, Xu K, Zhu D, Kelly C, Terhakopian A, Novelli A, Marini AM (2001) Nuclear factor  $\kappa$ B is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptors mediated neuroprotection. *Journal of Neurochemistry* 78:254-264.

Lipton SA, Nakanishi N (1999) Shakespear in love with NMDA receptors? *Nature Medicine* 5(3):270-271

Luttropp HH, Thomasson R, Dahm S, Persson J, Werner O (1994) Clinical experience with minimal flow xenon anesthesia. *Acta Anesthesiol. Scand.* 38(2):121-5

Lynch C, Baum J, Tenbrinck R (2000) Xenon Anesthesia. *Anesthesiology* 92:865-70

Ma D, Hossain M, Rajakumaraswamy N, Franks NP, Maze M (2003a) Combination of Xenon and Isoflurane Produces a Synergistic Protective Effect against Oxygen-Glucose Deprivation Injury in a Neuronal- Glial Co-culture Model. *Anesthesiology* 99:748-51

Ma D, Sanders RD, Halder S, Rajakumaraswamy N, Franks NP, Maze M (2004) Xenon Exerts Age-independent Antinociception in Fischer Rats. *Anesthesiology* 100:1313-18

Ma D, Wilhelm S, Maze M, Franks NP (2002) Neuroprotective and neurotoxic properties of the 'inert' gas xenon. *British Journal of Anesthesia* 89(5):739-46

Ma D, Yang H, Lynch J, Franks NP, Maze M, Grocott HP (2003b) Xenon Attenuates Cardiopulmonary Bypass-induced Neurologic and Neurocognitive Dysfunction in the Rat. *Anesthesiology* 98:690-8

Ma, D., Hossain, M., Chow, A., Arshad, M., Battson, R.M., Sanders, RD., Mehmet, H., Edwards, A.D., Franks, N.P. & Maze, M. (2005). Xenon and hypothermia combine to provide neuroprotection from neonatal asphyxia. *Ann Neurol*, 58, 182-93.

Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A (1996) NMDA Receptor Function and Human Cognition: The Effects of Ketamine in Healthy Volunteers. *Neuropsychopharmacology* 14(5):301-307

Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischaemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Research Bulletin* 46(4):281-309

Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C (1994) Overexpression of bcl-2 in transgenic mice protects neurones from naturally occurring cell death and experimental ischaemia. *Neuron* 13(4):1017-30

Mayumi Homi H, Yokoo N, Ma D, Warner DS, Franks NP, Maze M, Grocott HP (2003) The Neuroprotective Effect of Xenon Administration during Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *Anesthesiology* 99:876-81

Molnar Z, Blakemore C (1995) How do thalamic axons find their way to the cortex? *Trends Neurosci.* 18(9):389-97

Monti B, Contestabile A (2000) Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. *European Journal of Neuroscience* 12:3117-3123

Moore KL y Persaud TVN (Eds), *Human Birth Defects in: The Developing Human: Clinically Orientated Embryology* (6ª edición), 1998, WB Saunders Company, págs. 167-200

Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S (1995) Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x deficient mice. *Science* 267:1506-1510

Nagata A, Nakao S, Nishizawa N, Masuzawa M, Inada T, Murao K, Miyamoto E, Shingu K (2001) Xenon Inhibits but N<sub>2</sub>O Enhances Ketamine-Induced c-Fos Expression in the Rat Posterior Cingulate and Retrosplenial Cortices. *Anesth Analg* 92:362-8

Nakata Y, Goto T, Morita S (1997) Comparison of inhalation inductions with xenon and sevofurane. *Acta Anesthesiol Scand* 41:1157-61

Nakata Y, Goto T, Saito H, Ishiguro Y, Terui K, Kawakami H, Tsuruta Y, Niimi Y, Morita S (2000) Plasma concentration of fentanyl with xenon to block somatic and hemodynamic responses to surgical incision. *Anesthesiology* 92:1043-8

- Newcomer JW, Krystal JH (2001) NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans. *Hippocampus* 11 (5):529-42
- 5 O'Callaghan JP, Jensen KF (1992) Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13(1):113-22
- 10 Okabe S, Kim HD, Miwa A, Kuriu T, Okado H (1999) Continual remodeling of post-synaptic densities and its regulation by synaptic activity. *Nat. Neuroscience* 2:804-811
- Oliet SHR, Piet R, Poulain DA (2001) Control of Glutamate Clearance and Synaptic Efficacy by Glial Coverage of Neurons. *Science* 292:923-926
- 15 Olney JW (1969) Brain lesions, obesity & other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164(880):719-21
- Olney JW (2002a) New insights and issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 23(6):659-68
- 20 Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Muglia LJ, Jermakowicz WJ, D'Sa C, Roth KA (2002b) Ethanol-Induced Caspase-3 Activation in the in vivo Developing Mouse Brain. *Neurobiology of Disease* 9:205-219
- Olney JW, Wozniak DF, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Bittigau P, Ikonomidou C (2002c) The enigma of fetal alcohol neurotoxicity. *Ann Med* 34(2):109-19
- 25 Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Farber NB, Bittigau P, Ikonomidou C (2002d) Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol* 12(4):488-98
- 30 Olsen RW y DeLorey TM (1999) GABA & Glycine in: Siegel SJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (Eds) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular & Medical Aspects*, 6ª edición, Lippincott-Raven, págs. 336-346
- Philpot BD, Sekhar AK, Shouvali HZ, Bear MF (2001) Visual Experience and Deprivation Bidirectionally Modify the Composition and Function of NMDA Receptors in the Visual Cortex. *Neuron* 29:157-169
- 35 Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hübner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C (1999) NMethyl- D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2508-2513
- 40 Rinkenberger JL, Horning S, Klocke B, Roth K, Korsmeyer SJ (2000) Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes & Development* 14:23-27
- Sanders RD, Franks NP, Maze M (2003) Xenon: no stranger to anesthesia. *British Journal of Anesthesia* 91(5):709-17
- 45 Scheetz AJ, Nairn AC, Constantine-Paton M (2000) NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses. *Nature Neuroscience* 3(3)
- Schmidt M, Marx T, Kotzerke J, Lüderwald S, Armbruster S, Topalidis P, Schirmer U, Reinelt H (2001) Cerebral and regional organ perfusion in pigs during xenon anesthesia. *Anesthesia* 56:1154-1159
- 50 Schmidt, M., Marx, T., Gloggl, E., Reinelt, H. & Schirmer, U. (2005). Xenon attenuates cerebral damage after ischemia in pigs. *Anesthesiology*, 102, 929-36.
- Sherrard RM, Bower AJ (1998) Role of afferents in the development and cell survival of the vertebrate nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25(7-8):487-95
- 55 Shichino T, Murakawa M, Adachi T, Miyazaki Y, Segawa H, Fukuda K, Mori K (2002) Effects of xenon on acetylcholine release in the rat cerebral cortex in vivo. *British Journal of Anesthesia* 88(6):866-8
- 60 Sloviter RS (2002) Apoptosis: a guide for the perplexed. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 23(1):19-24
- Stowe DF, Rehmert GC, Kwok WM, Weigt HU, Georgieff M, Bosnjak ZJ (2000) Xenon Does Not Alter Cardiac Function or Major Cation Current in Isolated Guinea Pig. *Hearts or Myocytes*, *Anesthesiology* 92:516-22
- 65 Tokuyama S, Zhu H, Oh S, Ho IK, Yamamoto T (2001) Further evidence for a role of NMDA receptors in the locus coeruleus in the expression of withdrawal syndrome from opioids. *Neurochemistry International* 39:103-109

- Tsai G, Coyle JT (1998) The Role of Glutamatergic Neurotransmission in the Pathophysiology of Alcoholism. *Annu Rev Med* 49:173-84
- 5 Wagey R, Hu J, Pelech SL, Raymond LA, Krieger C (2001) Modulation of NMDA-mediated excitotoxicity by protein kinase C. *Journal of Neurochemistry* 78:715-726
- Walton M, MacGibbon G, Young D, Sirimanne E, Williams C, Gluckman P, Dragunow M (1998) Do c-Jun, c-Fos and Amyloid Precursor Protein Play a Role in Neuronal Death or Survival? *Journal of Neuroscience Research* 53:330-342
- 10 Wilhelm S, Ma D, Maze M, Franks NP (2002) Effects of Xenon on In Vitro and In vivo Models of Neuronal Injury. *Anesthesiology* 96:1485-91
- 15 Williams DG, Howard RF (2003) Epidural analgesia in children. A survey of current opinions and practises amongst UK paediatric anaesthetists. *Paediatric Anesthesia* 13:769-776
- Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TV, Hunt SP (1990) Differential expression of intermediate early genes in the hippocampus & spinal cord. *Neuron* 4(4):603-14
- 20 Yoshida H, Kong Y, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW (1998) Apaf-1 Is Required for Mitochondrial Pathway of Apoptosis and Brain Development. *Cell* 94:739-750
- Young C, Klocke BJ, Tenkova T, Choi J, Labuyere J, Qin YQ, Holtzman DM, Roth KA, Olney, JW (2003) Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death and Differentiation* 10:1148-1155
- 25 Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Med* 5:448-53
- 30 Young, T. Tenkova, H.H. Wang, Y.Q. Qin, J. Labuyere, V. Jevtovic-Todorovic, J.W. Olney (2003) A single sedating dose of ketamine, causes neuronal apoptosis in developing mouse brain, *Society for Neuroscience Abstract* (en prensa).
- 35 Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir uno o más déficits neurológicos inducidos por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el déficit neurológico es neurodegeneración.
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el déficit neurológico está asociado con apoptosis neuronal.
- 10 4. Utilización según la reivindicación 1, en la que el déficit neurológico está asociado con necrosis neuronal.
5. Utilización según la reivindicación 1, en la que el déficit neurológico es un déficit de aprendizaje, de memoria, neuromotor, neurocognitivo o psicocognitivo.
- 15 6. Utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la neurodegeneración inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.
7. Utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la apoptosis neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.
- 20 8. Utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la necrosis neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.
9. Utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir la lesión neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.
- 25 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anestésico es isoflurano, sevoflurano o desflurano.
- 30 11. Utilización según la reivindicación 10, en la que el xenón se administra en combinación con un anestésico seleccionado de entre isoflurano, sevoflurano o desflurano.
12. Utilización según la reivindicación 11, en la que el anestésico es isoflurano y la lesión neuronal es una lesión neuronal inducida por isoflurano.
- 35 13. Utilización según la reivindicación 11, en la que el anestésico es sevoflurano y la lesión neuronal es una lesión neuronal inducida por sevoflurano.
- 40 14. Utilización según la reivindicación 11, en la que el anestésico es desflurano y la lesión neuronal es una lesión neuronal inducida por desflurano.
15. Utilización de xenón en la preparación de un medicamento para prevenir una lesión neuronal inducida por isoflurano y/o inducida por sevoflurano y/o inducida por desflurano en un sujeto neonatal.
- 45 16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el xenón se administra en combinación con un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable.
17. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el medicamento está en forma gaseosa.
- 50 18. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el medicamento se administra por inhalación.
19. Utilización según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en la que el xenón se administra por perfusión.
- 55 20. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el medicamento está en forma de un líquido o una disolución.
- 60 21. Utilización según la reivindicación 20, en la que el medicamento está en forma de una emulsión lipídica.
22. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el medicamento está en una forma apta para la administración intravenosa, neuraxial o transdérmica.
- 65 23. Xenón para su utilización en la prevención de uno o más déficits neurológicos inducidos por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.

24. Xenón para su utilización en la prevención de la neurodegeneración inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.
- 5 25. Xenón para su utilización en la prevención de la apoptosis neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.
26. Xenón para su utilización en la prevención de la necrosis neuronal inducida por anestésicos GABAérgicos en un sujeto neonatal.
- 10 27. Xenón para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 en el que el xenón es para su administración al sujeto simultáneamente en combinación, secuencialmente o por separado con otro agente anestésico.



FIGURA 1A

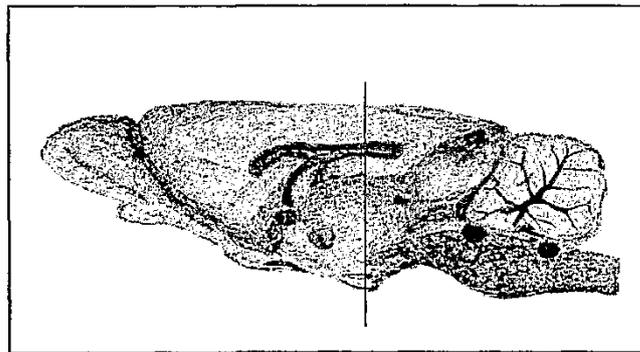


FIGURA 1B

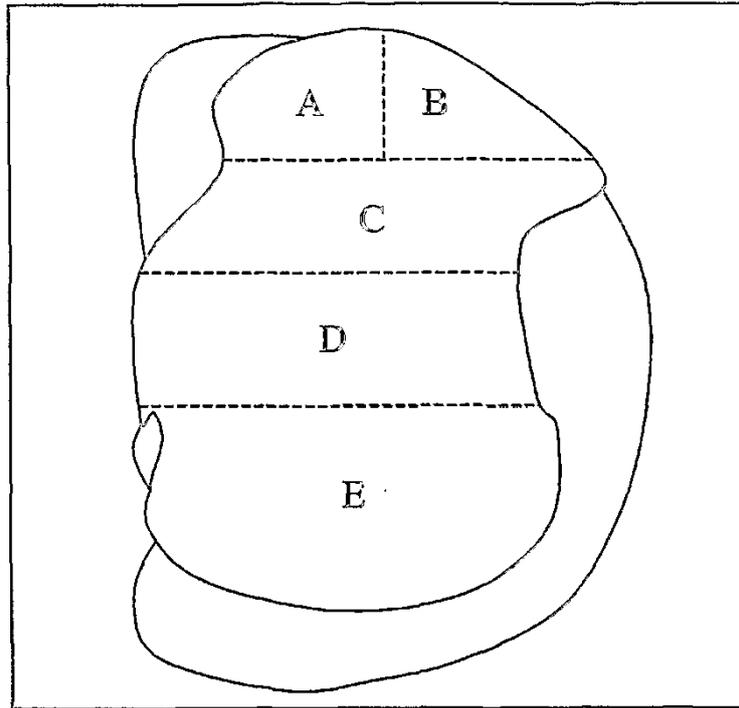


FIGURA 1C

FIGURA 2A

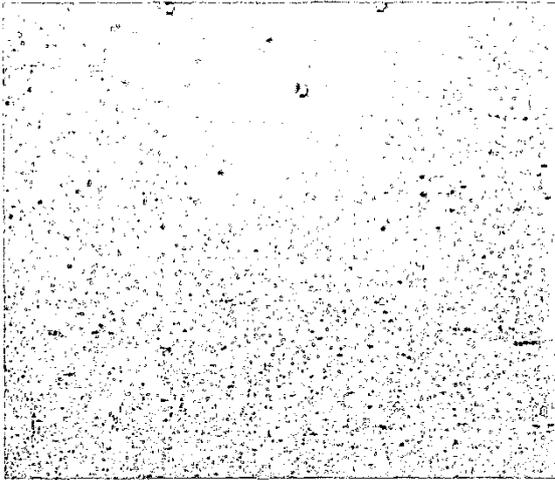


FIGURA 2B

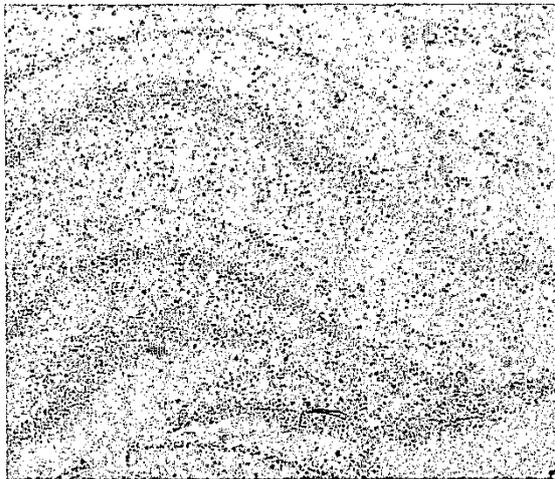
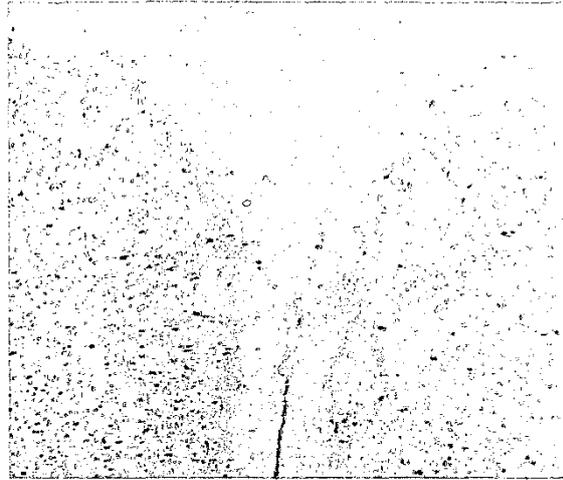


FIGURA 2C



FIGURA 2D

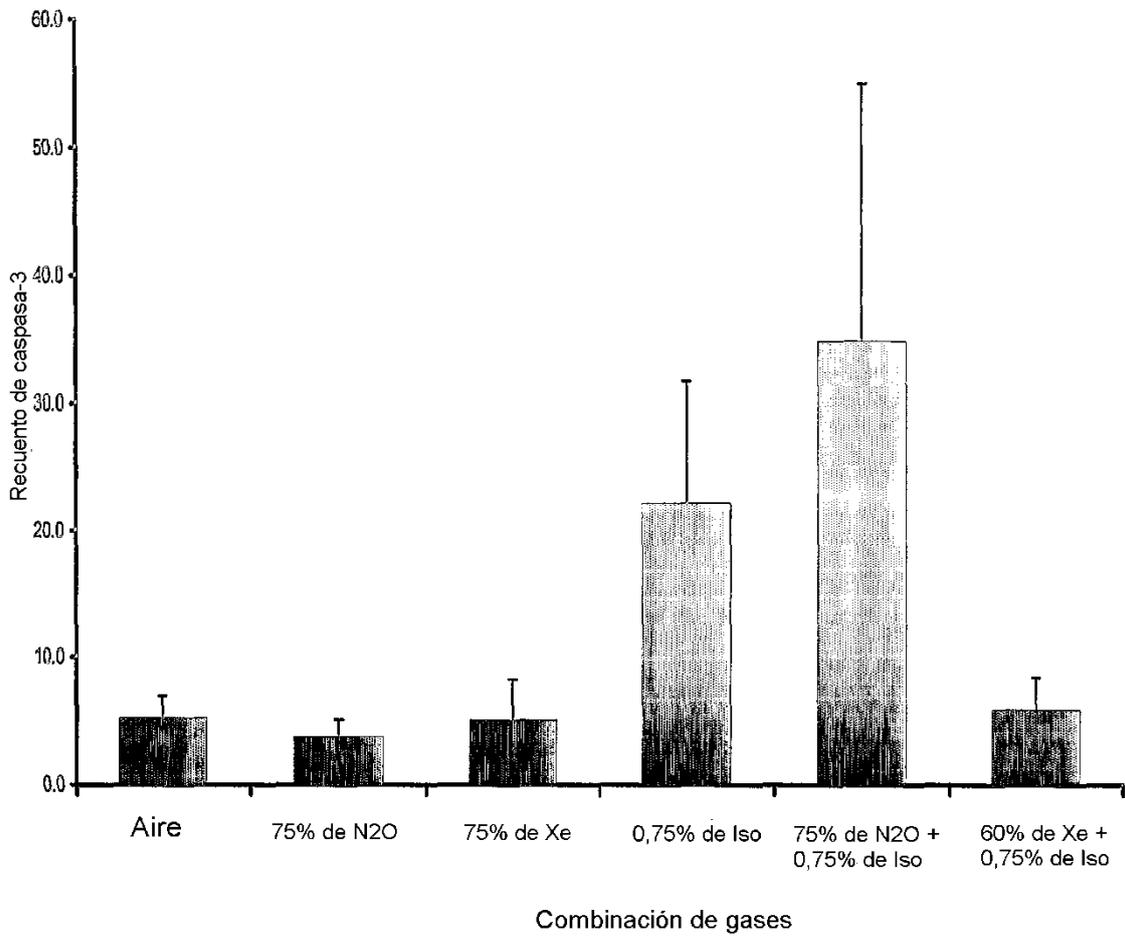


FIGURA 3

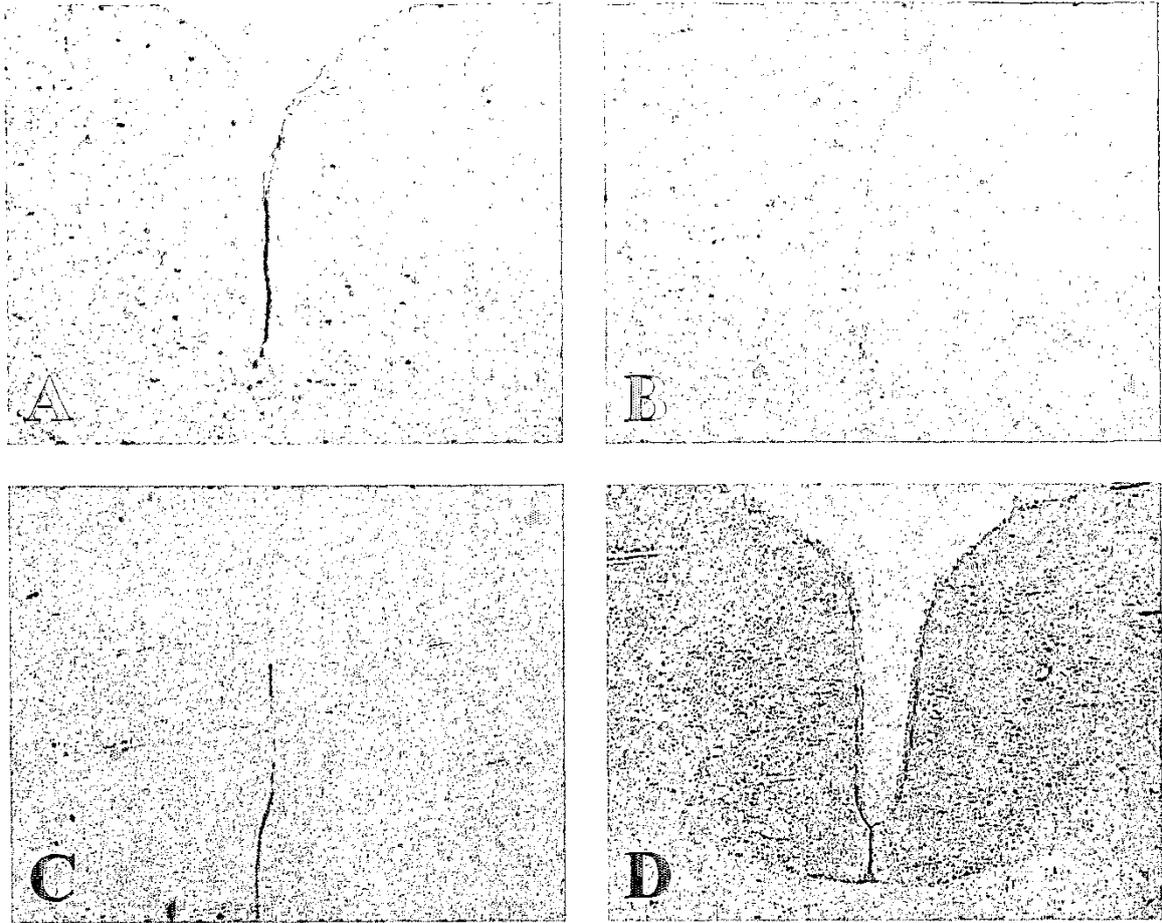


FIGURA 4

FIGURA 5A

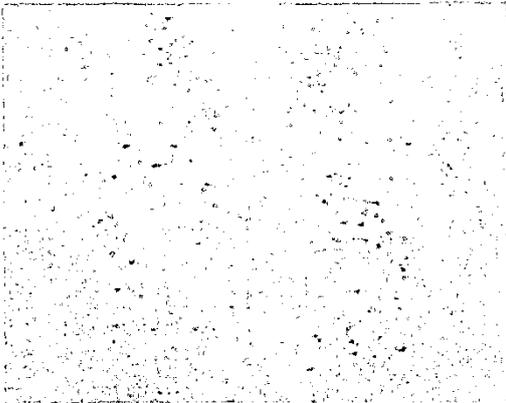


FIGURA 5B

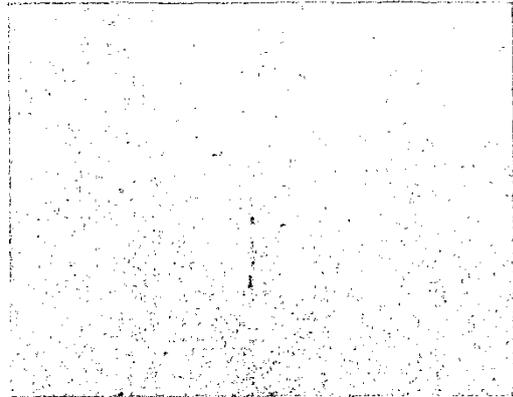


FIGURA 5C

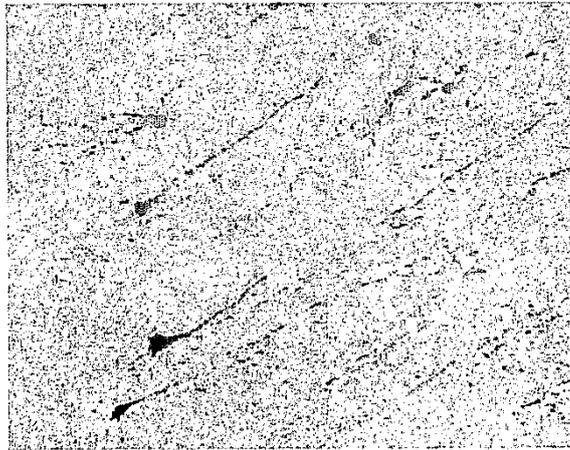
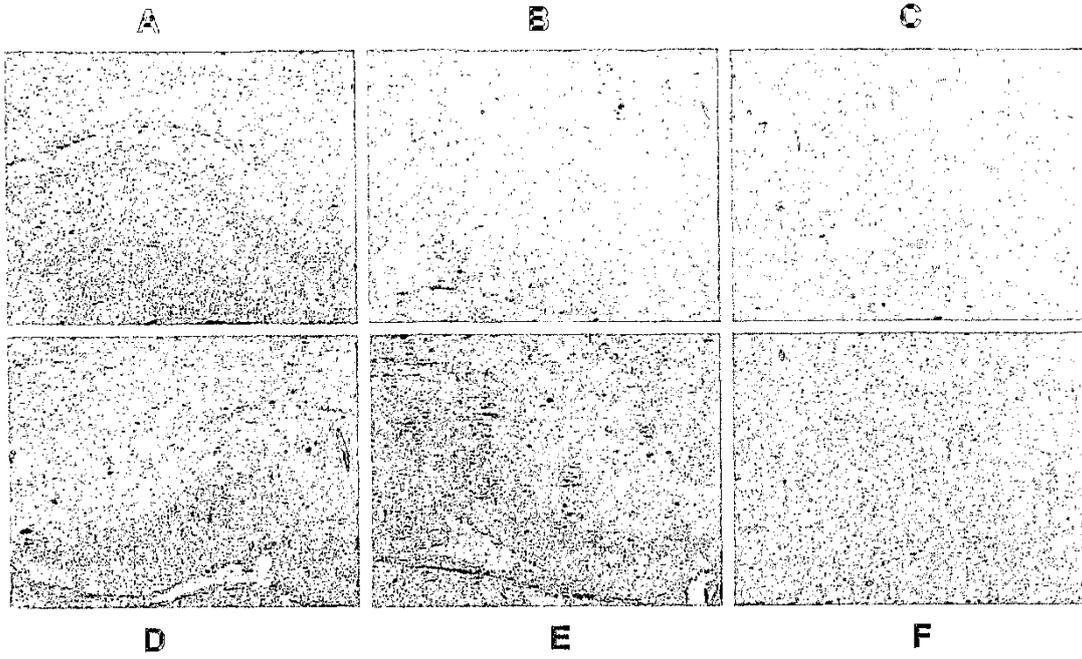


FIGURA 6



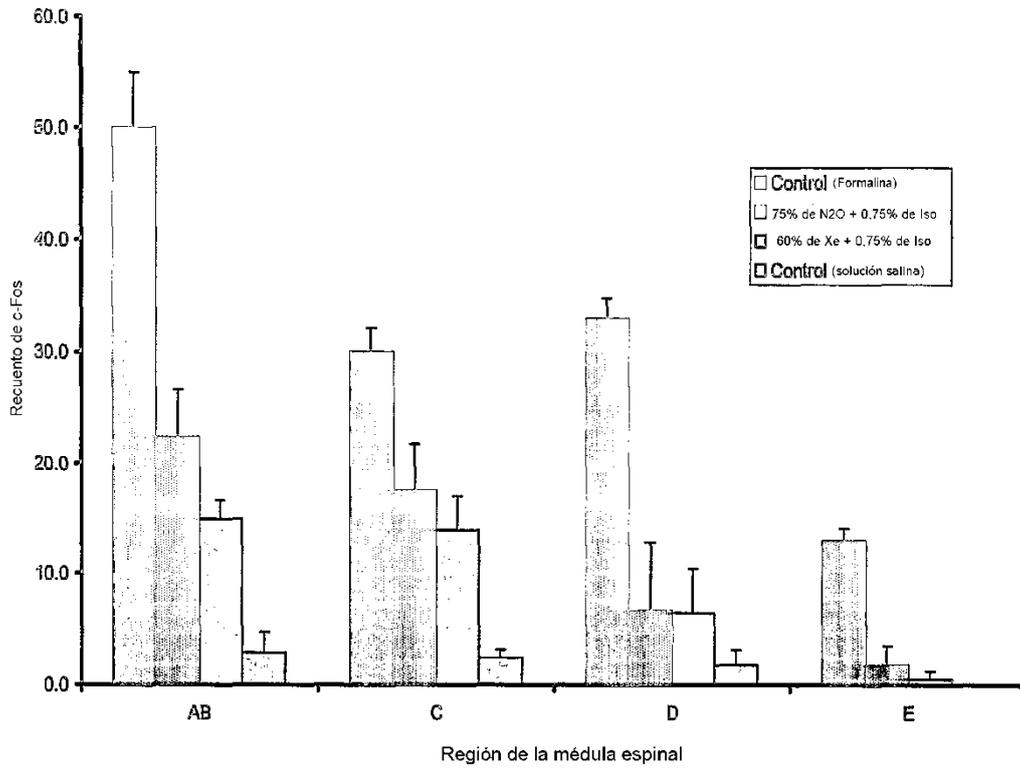


FIGURA 7A



FIGURA 7B

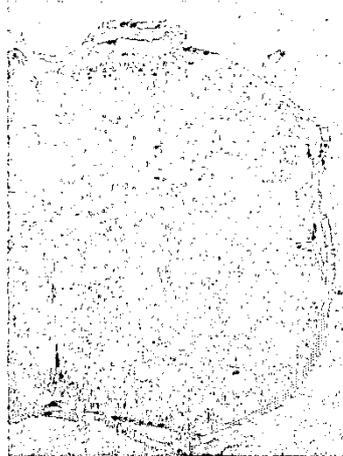


FIGURA 7C

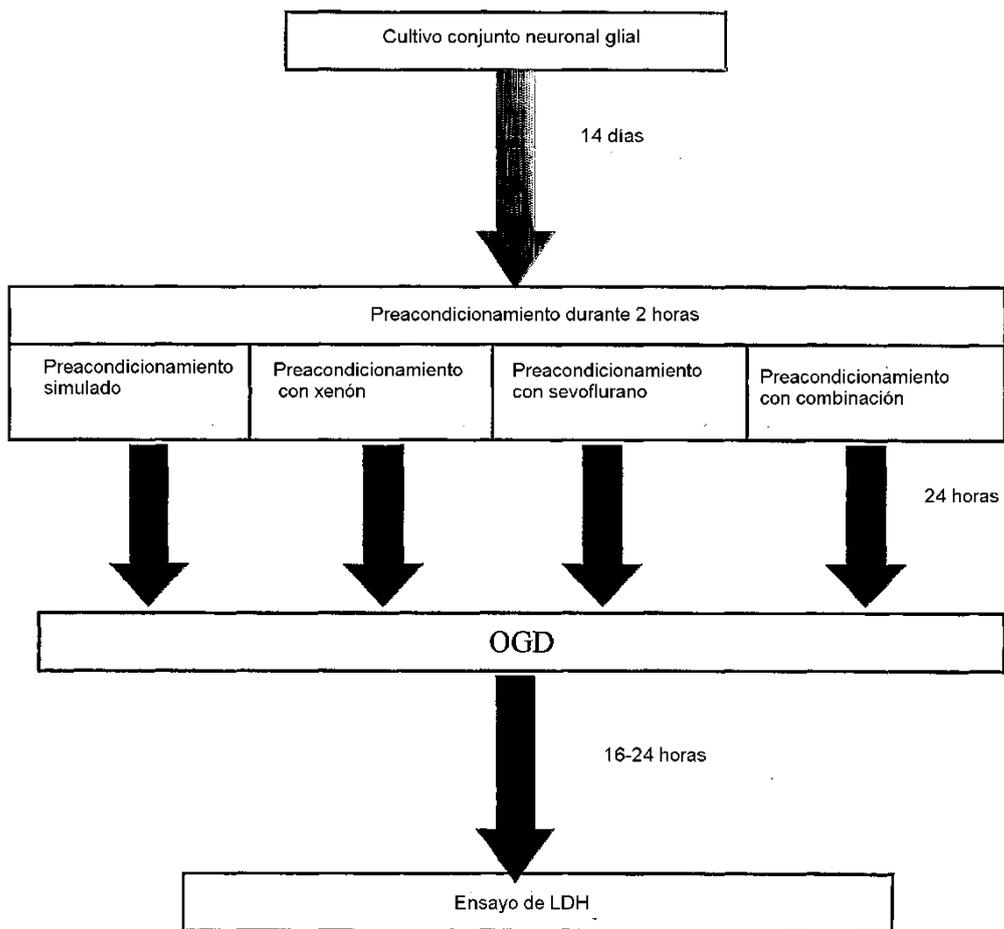


FIGURA 8

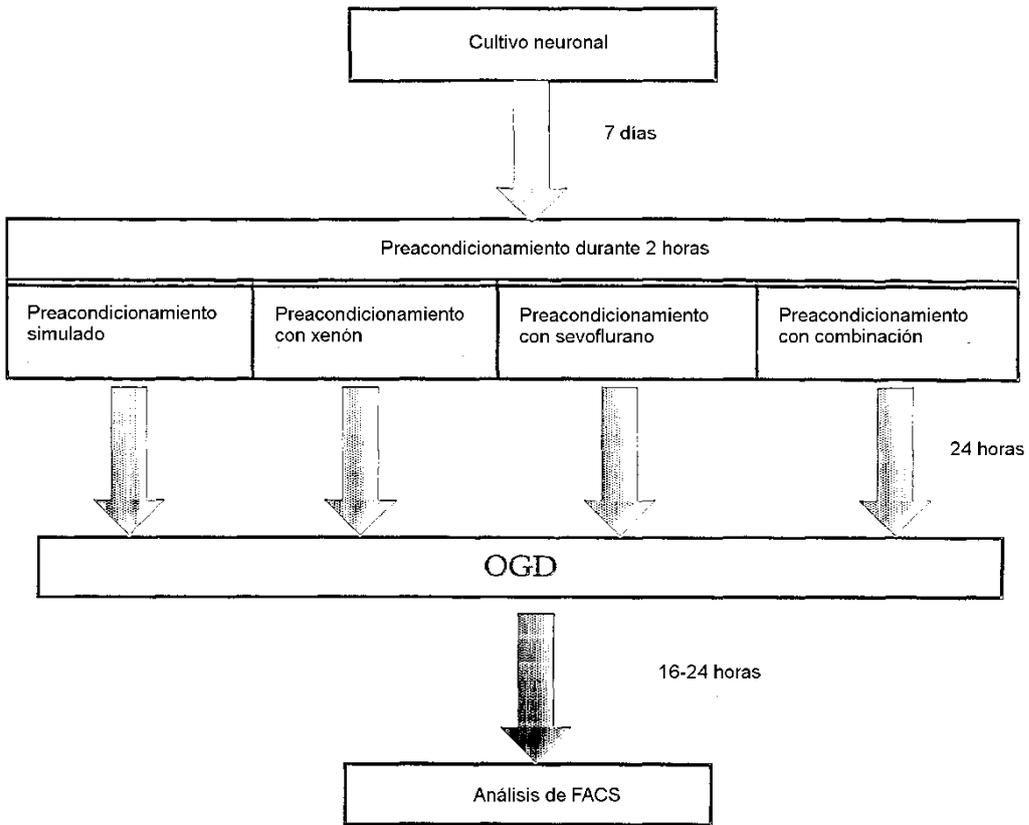


FIGURA 9

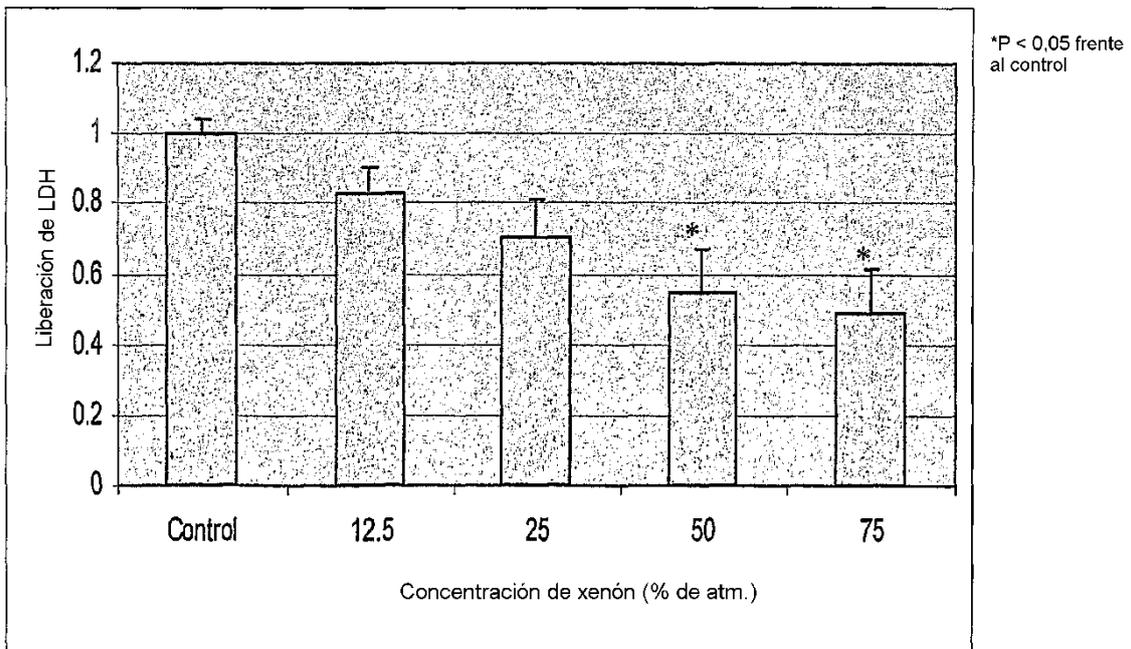


FIGURA 10

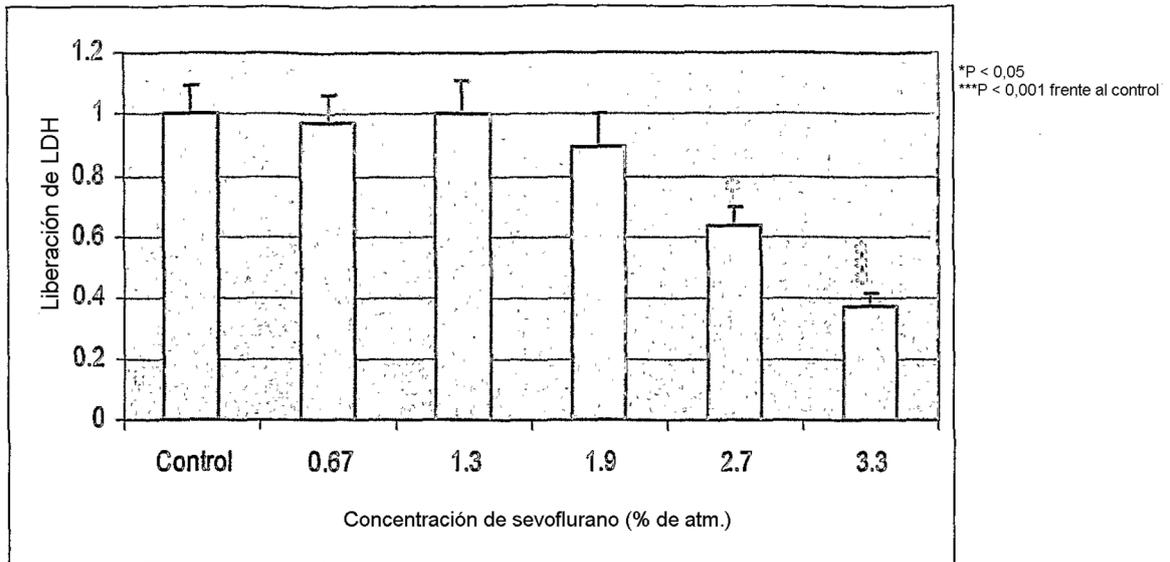


FIGURA 11

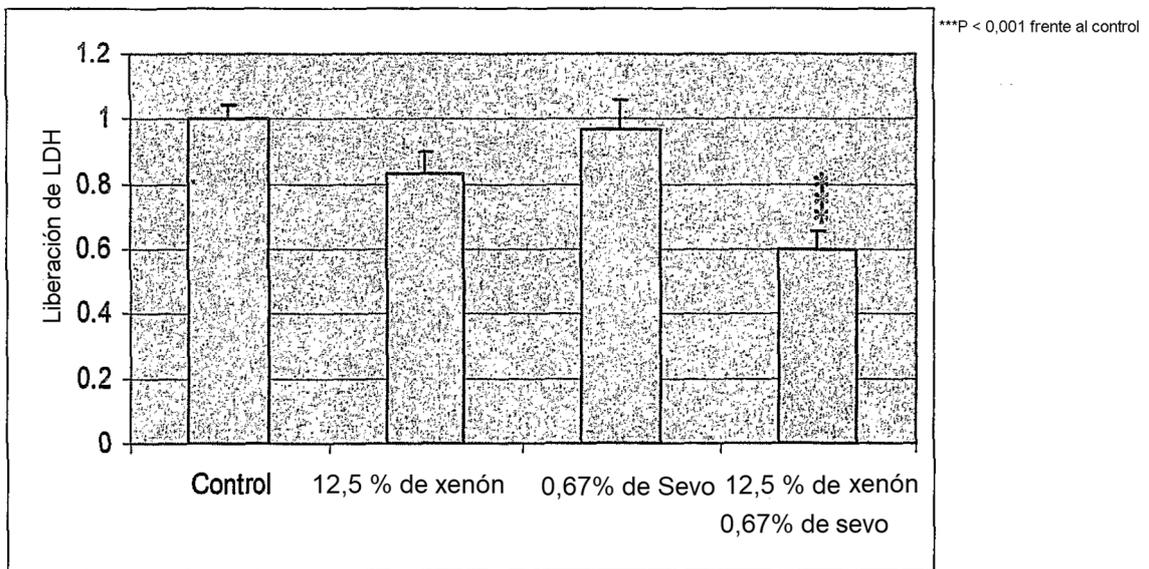


FIGURA 12

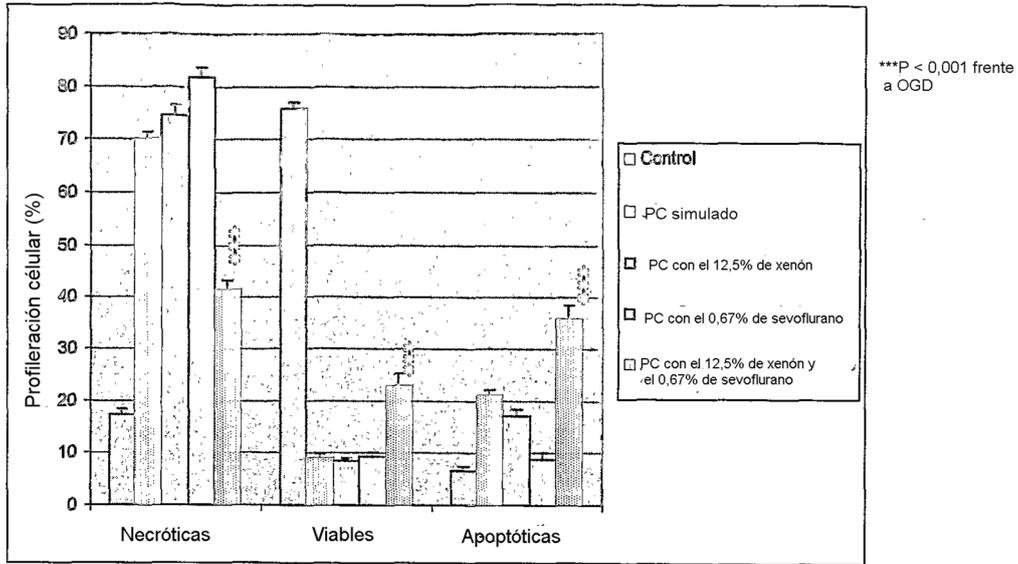


FIGURA 13