

Niveles plasmáticos de midkina en pacientes con trastorno por uso de cocaína en abstinencia

Plasma midkine levels in patients with cocaine use disorder during abstinence

IÑIGO PALLARDO-FERNÁNDEZ*, NURIA GARCÍA-MARCHENA**, CARMEN RODRÍGUEZ-RIVERA*, FRANCISCO JAVIER PAVÓN**, CARMEN GONZÁLEZ-MARTÍN*, FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA**, LUIS F. ALGUACIL*.

* Facultad de Farmacia / Instituto de Estudios de las Adicciones. Universidad San Pablo-CEU, CEU Universities, Campus Montepríncipe, España.

** Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA). Hospital Regional Universitario de Málaga/Universidad de Málaga, España.

Resumen

Diversos estudios preclínicos han sugerido que la midkina endógena podría jugar un papel modulador clave sobre los efectos neurotóxicos y adictivos de distintas drogas, incluidos los psicoestimulantes. Esta hipótesis no ha sido aún explorada en humanos. Como primer paso en esta dirección, en el presente trabajo hemos medido los niveles plasmáticos de midkina en 75 pacientes con trastorno por uso de cocaína en abstinencia y 26 controles apareados con los anteriores por sexo, edad e índice de masa corporal. Los pacientes fueron además divididos en un grupo de abstinencia temprana (menos de un mes, $n = 30$) y otro de abstinencia tardía (más de un mes, $n = 45$). Se cuantificaron los niveles plasmáticos de midkina de todos los participantes mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas. Los pacientes en abstinencia temprana mostraron un incremento del 60% en su concentración plasmática de midkina con respecto a los controles que tendió a desaparecer en los pacientes con periodos de abstinencia más prolongados. Los resultados demuestran que los niveles periféricos de midkina están estrechamente relacionados con el uso de cocaína y apoyan la idea de que dicha citoquina podría jugar un papel protector limitando la actividad biológica de los psicoestimulantes.

Palabras clave: Midkina; trastorno por abuso de cocaína; abstinencia de cocaína; neuroprotección; psicoestimulantes.

Abstract

Preclinical evidence suggests that endogenous midkine could play a key modulatory role on the neurotoxic and addictive effects of different kinds of drugs of abuse, including psychostimulants. However, this hypothesis has not yet been explored in humans. As a first approach to progress in this knowledge, we have comparatively studied plasma midkine levels in 75 patients with cocaine use disorder under abstinence and 26 control subjects matched for sex, age and body mass index. Patients were further segmented into early-abstinent (up to one month of abstinence, $n = 30$) and late-abstinent (more than one month of abstinence, $n = 45$). Midkine levels were quantified in plasma samples of all the participants by enzyme-linked immunosorbent assays. Early-abstinent patients exhibited a 60% increase of midkine plasma concentration in comparison with the controls. This elevation tended to normalize upon the progression of abstinence. The results obtained demonstrate that peripheral midkine levels are closely related to cocaine use and are consistent with the idea that this cytokine could play a protective role by limiting the biological activity of psychostimulants.

Keywords: Midkine; cocaine use disorder; cocaine abstinence; neuroprotection; psychostimulants.

Recibido: Marzo 2020; Aceptado: Diciembre 2020.

Enviar correspondencia a:

Luis F Alguacil. Universidad San Pablo-CEU. Campus de Montepríncipe, 28925 Alcorcón, España. Tel.: +34 91 3724700 ext. 14725.
E-mail: lalguacil@ceu.es

La midkina es una citoquina que promueve la supervivencia y diferenciación de diferentes tipos de células y parece jugar un papel importante en el desarrollo y reparación del sistema nervioso central después de una lesión (Muramatsu, 2011). Una cantidad creciente de datos experimentales tiende a mostrar que la función endógena de la midkina podría ser crítica para limitar las propiedades neurotóxicas y adictivas de diferentes drogas de abuso (Herradón y Pérez-García, 2014; Alguacil y Herradón, 2015). En el caso particular de los psicoestimulantes, se ha encontrado que los ratones con el gen de midkina inactivado muestran un agravamiento de la astrocitosis inducida por anfetaminas en el cuerpo estriado (Gramage, Martín, Ramanah, Pérez-García y Herradón, 2011) y son particularmente resistentes a extinguir la preferencia condicionada de lugar inducida por la cocaína (Gramage et al., 2013). A pesar de estos interesantes resultados, que sepamos no hay datos que apoyen una posible relación entre el abuso de psicoestimulantes y la función de midkina en humanos. Como primer paso para aumentar este conocimiento, hemos comparado los niveles plasmáticos de midkina entre consumidores de cocaína abstinentes y sujetos de control, y también hemos estudiado posibles correlaciones entre los niveles plasmáticos de midkina y variables relacionadas con el consumo de cocaína como son los años de consumo de la droga, la severidad de la adicción a cocaína y la duración de la abstinencia.

Método

Este estudio fue aprobado por los Comités de Ética del Hospital Regional Universitario de Málaga y de la Universidad San Pablo-CEU, y cumplió con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos (Declaración de Helsinki) así como con el Reglamento General de Protección de Datos de la Unión Europea (2016/679). Todos los sujetos incluidos en el ensayo otorgaron su consentimiento informado. El estudio se realizó en una población caucásica blanca e incluyó una muestra de pacientes con diagnóstico de Trastorno por Consumo de Cocaína (TCC) actualmente en abstinencia, así como sujetos de control sanos. Los pacientes fueron reclutados en las instalaciones para el tratamiento de adicciones del Centro Provincial de Drogodependencias (Málaga, España). Se excluyeron aquellos sujetos que cumplían criterios de dependencia de alcohol o de cannabis durante el mes anterior al estudio. Los sujetos de control procedieron de bases de datos de sujetos sanos dispuestos a participar en proyectos de investigación médica en el Hospital Regional Universitario de Málaga (Málaga, España), y se emparejaron con los pacientes por sexo, edad e índice de masa corporal. El TCC se evaluó de acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, Cuarta Edición-Texto Revisado (DSM-IV-TR) (American Psychia-

tric Association, 2000) utilizando la versión en español de la Entrevista de Investigación Psiquiátrica para Trastornos Mentales y por Sustancias (PRISM) (Torrens, Serrano, Astals, Pérez-Domínguez y Martín-Santos, 2004). El grupo de pacientes con TCC estuvo formado por 75 sujetos, 88% varones, con $34,1 \pm 7,5$ años de edad e $IMC = 24,9 \pm 4,6$ kg/m² (medias \pm desviaciones estándar). Estos sujetos habían consumido cocaína durante $5,7 \pm 5,4$ años, alcanzaban una puntuación de $7,1 \pm 3,7$ en la escala de severidad del rasgo de cocaína para el abuso y la dependencia de cocaína (lo que refleja un consumo elevado) y habían sido abstinentes de cocaína durante $13,7 \pm 32,2$ meses; el 32,4% había mostrado un uso problemático de alcohol en una etapa anterior de la vida (27% en el último año) y se había mantenido abstinencia de alcohol durante una media de 127,8 días antes del reclutamiento. El grupo de control estuvo formado por 26 sujetos, 85% varones, con $36,8 \pm 10,1$ años de edad e $IMC = 24,6 \pm 2,8$ kg/m².

Las muestras de sangre de los participantes fueron extraídas por la mañana, después de un ayuno de 8 a 12 horas, por parte de enfermeras experimentadas. Se extrajo sangre venosa en tubos EDTA de 10 ml (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) que se centrifugaron inmediatamente a $2200 \times g$ durante 15 min ($4^{\circ}C$) y que se analizaron individualmente para detectar enfermedades infecciosas utilizando tres pruebas rápidas comerciales para VIH, hepatitis B y hepatitis C (Estrasburgo, Cedex, Francia). Las muestras de plasma se caracterizaron y registraron individualmente y se almacenaron a $-80^{\circ}C$ hasta el día del análisis, que se realizó mediante el uso de un kit ELISA tipo sándwich para la determinación de midkina (MKELISA, Cellmid, Sídney, Australia) según las instrucciones del fabricante (entre las que se contempla el uso de duplicados). Se seleccionó este kit en particular porque ha sido desarrollado específicamente para muestras humanas, ofrece una alta sensibilidad (límite de detección = 8 pg/ml), alta especificidad (0 reactividad a pleiotrofina, una citoquina estrechamente relacionada con la midkina) y una cuantificación fiable del analito en concentraciones de hasta 10 $\mu g/ml$.

De acuerdo con la literatura, que muestra que las características neurobiológicas y fenomenológicas más prominentes de la abstinencia de cocaína ocurren dentro de las primeras semanas (Pathiraja, Marazziti, Cassano, Diamond y Borison, 1995), para el análisis estadístico separamos a los pacientes en un grupo de abstinencia temprana (hasta un mes de abstinencia, $n = 30$) y un grupo de abstinencia tardía (más de un mes de abstinencia, $n = 45$). Se compararon los niveles de midkina entre estos dos grupos y con los sujetos de control mediante un análisis unilateral de varianza (ANOVA) seguido de pruebas post hoc Bonferroni. Las posibles correlaciones entre los niveles de midkina y cada una de las tres variables relacionadas con el consumo de cocaína (puntuación de severidad, duración de consumo y duración de abstinencia) se estudiaron primero mediante

el cálculo de coeficientes de Pearson. Estas correlaciones se investigaron también después de segmentar las anteriores variables en cinco grupos según criterios percentiles, aplicando para ello coeficientes de Spearman. El nivel de significación estadística se estableció siempre en $p < ,05$.

Resultados

Los pacientes con TCC en abstinencia temprana exhibieron un aumento significativo del 60 % en los niveles plasmáticos de midkina con respecto a los sujetos de control; esta diferencia se redujo posteriormente hasta perder significación estadística cuando la abstinencia fue superior a un mes, como se muestra en el grupo de abstinencia tardía (Figura 1).

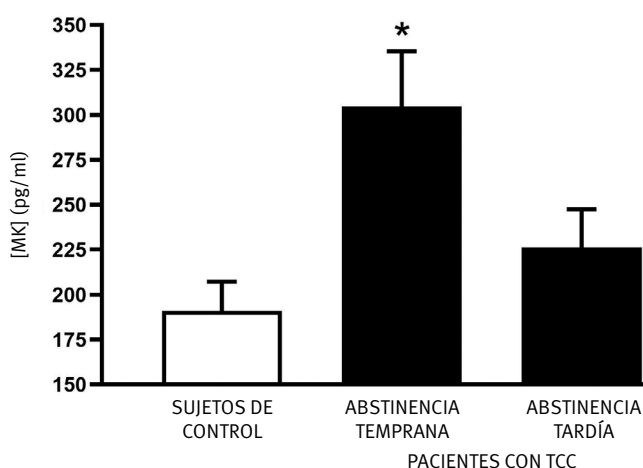


Figura 1. Concentración de midkina en el plasma de los sujetos de control y en pacientes con TCC. * $p < ,05$ vs. sujetos de control.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan la primera evidencia de una relación significativa entre el consumo de cocaína y la regulación de midkina en humanos. Teniendo en cuenta que nuestros pacientes eran abstinentes a la cocaína en el momento de la recogida de las muestras, queda por establecer si la elevación de la midkina plasmática fue una consecuencia del uso previo de cocaína o si fue provocada por la abstinencia de cocaína; en cualquier caso, los niveles de la citoquina retrocedían consistentemente hasta los valores de control según progresaba la abstinencia, por lo que parece que evolucionaban de forma inversa a la dependencia de cocaína. Que sepamos, apenas se ha estudiado la correlación entre niveles centrales y periféricos de midkina en la salud o en la enfermedad; a pesar de esto, los cambios de midkina en sangre se han asociado a varios trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia (Shimizu et al., 2003), la enfermedad de Alzheimer (Salama et al., 2005) o el autismo (Esnafoglu y Cirrik, 2018), lo que sugiere que los niveles plasmáticos de midkina podrían ser sensibles a cambios patológicos que afectan bien a los niveles o a la función de midkina en el cerebro. Según esta idea, es posible que

Tabla 1. Análisis de correlaciones entre los niveles de midkina y las variables asociadas al consumo de cocaína.

	ANÁLISIS DE DATOS NO AGRUPADOS		ANÁLISIS DE DATOS SEGMENTADOS	
	Coefficiente de correlación	Valor p	Coefficiente de correlación	Valor p
Severidad de TCC (puntuación DSM)	-0,061	0,601	-0,072	0,538
Duración de consumo (años)	-0,117	0,318	-0,045	0,699
Duración de abstinencia (meses)	-0,140	0,231	-0,253	0,029

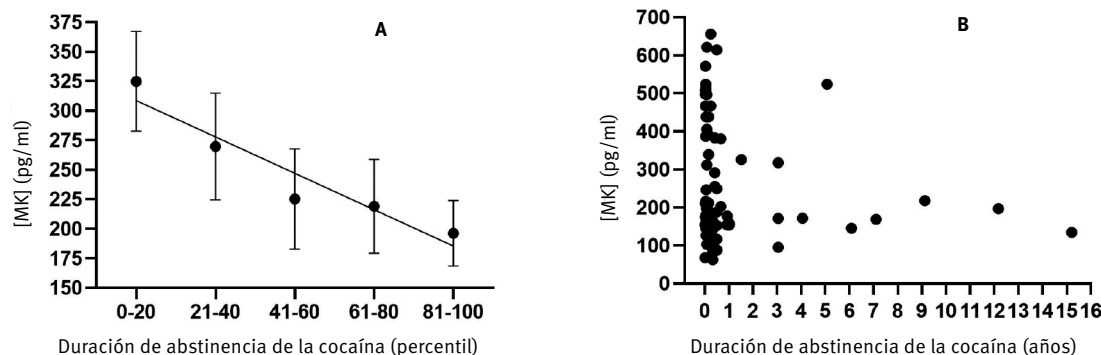


Figura 2. Concentración de midkina en el plasma de pacientes con TCC abstinentes. El panel A muestra la regresión lineal obtenida ($r^2 = 0,91$) tras segmentar la duración de la abstinencia de cocaína en 5 grupos percentiles (los puntos representan medias \pm SEM). El panel B muestra los datos no agrupados.

nuestro hallazgo de niveles plasmáticos de midkina elevados en pacientes fuese secundario a una regulación positiva de la midkina central desencadenada por el consumo de cocaína y/o la abstinencia de cocaína. Tal efecto sería coherente con los datos preclínicos que sugieren un papel neuroprotector de la regulación positiva de midkina en situaciones que involucran lesión del tejido cerebral tales como la exposición a drogas, la isquemia y las alteraciones neurodegenerativas (Muramatsu, 2011; Herradón y Pérez García, 2014; Alguacil y Herradón, 2015). Obviamente, esta hipótesis necesita más pruebas ya que las elevaciones de los niveles de midkina en la periferia también podrían reflejar otras alteraciones relacionadas con el consumo de cocaína, no necesariamente de origen central. Así, por ejemplo, se sabe que las células endoteliales vasculares liberan midkina (Fujisawa et al., 1998), y esto podría verse afectado por las potentes acciones cardiovasculares de la cocaína. Además, algunas otras afecciones con mayor incidencia entre los adictos a las drogas también podrían contribuir a una elevación de la midkina en sangre en estos sujetos, como por ejemplo la presencia de enfermedad renal crónica (Campbell et al., 2017), neoplasias malignas (Jones, 2014) o trastornos inmunológicos (Sorrelle, Domínguez y Brekken, 2017). Una limitación de este estudio es la imposibilidad de descartar la influencia del consumo de alcohol o tabaco sobre los cambios observados en los niveles plasmáticos de midkina. Aunque nuestros pacientes no estaban abusando de alcohol cuando se recogieron las muestras, no puede descartarse un consumo entre leve y moderado, algo que podría afectar a la expresión de midkina en el cerebro (Flatscher-Bader y Wilce, 2008). Los estudios futuros deben monitorear también de forma específica el consumo de tabaco, dado que algunos trabajos han mostrado que este consumo aumenta los niveles séricos de midkina (Ito et al., 2019), aunque otros autores no han encontrado este efecto (Salaru et al., 2014). En consecuencia, se necesita más investigación para confirmar los resultados de este estudio y proporcionar una mejor comprensión de la participación de la midkina en el TCC; en este sentido, los estudios de correlación entre niveles de midkina en líquido cefalorraquídeo y plasma parecen de especial relevancia.

Reconocimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad-Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (PND 2016/025, 2017/043, 2018/033 and 2018/044), el Instituto de Salud Carlos III (Subprograma Redes Temáticas RETICS, Red de Trastornos Adictivos, RD RD16/0017/0001 and RD16/0017/0017), la Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta de Andalucía-Fundación Progreso y Salud (PI-0140-2018) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regio-

nal-Unión Europea (FEDER-UE). Los autores también agradecen al profesor Gonzalo Herradón su valioso asesoramiento científico.

Conflicto de intereses

Los autores declaran la inexistencia de conflicto de interés.

Referencias

- Alguacil, L. F. y Herradón, G. (2015). Midkine and pleiotrophin in the treatment of neurodegenerative diseases and drug addiction. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 10, 28-33. doi:10.2174/1574889810666150326103916.
- American Psychiatric Association (2000). DSM-IV-TR: Diagnostic and statistical manual of mental disorders, text revision. Washington DC: American Psychiatric Association.
- Campbell, V. K., Anstey, C. M., Gately, R. P., Comeau, D. C., Clark, C. J., Noble, E. P.,... Gray, N. A. (2017). Urine and serum midkine levels in an Australian chronic kidney disease clinic population: An observational study. *BMJ Open*, 7, e014615. doi:10.1136/bmjopen-2016-014615.
- Esnafoğlu, E. y Cirrik, S. (2018). Increased serum midkine levels in autism spectrum disorder patients. *International Journal of Neuroscience*, 128, 677-681. doi:10.1080/00207454.2017.1408620.
- Flatscher-Bader, T. y Wilce, P. A. (2008). Impact of alcohol abuse on protein expression of midkine and excitatory amino acid transporter 1 in the human prefrontal cortex. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 32, 1849-1858. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00754.x.
- Fujisawa, K., Matsumoto, Y., Muramatsu, H., Shinzato, T., Hiramatsu, K., Horie, K.,... Maeda, K. (1998). Increased serum midkine levels during hemodialysis using heparin in chronic renal failure. *Journal of Biochemistry*, 123, 864-869. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022017.
- Gramage, E., Martín, Y. B., Ramanah, P., Pérez-García, C. y Herradón, G. (2011). Midkine regulates amphetamine-induced astrogliosis in striatum but has no effects on amphetamine-induced striatal dopaminergic denervation and addictive effects: Functional differences between pleiotrophin and midkine. *Neuroscience*, 190, 307-317. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.014.
- Gramage, E., Pérez-García, C., Vicente-Rodríguez, M., Bollen, S., Rojo, L. y Herradón, G. (2013). Regulation of extinction of cocaine-induced place preference by midkine is related to a differential phosphorylation of peroxiredoxin 6 in dorsal striatum. *Behavioural Brain Research*, 253, 223-231. doi:10.1016/j.bbr.2013.07.026.
- Herradón, G. y Pérez-García, C. (2014). Targeting midkine and pleiotrophin signalling pathways in addiction and neurodegenerative disorders: Recent progress and

- perspectives. *British Journal of Pharmacology*, 171, 837-848. doi:10.1111/bph.12312.
- Ito, M., Oshima, Y., Yajima, S., Suzuki, T., Nanami, T., Shiratori, F.,... Shimada, H. (2019). Diagnostic impact of high serum midkine level in patients with gastric cancer. *Annals of Gastroenterological Surgery*, 3, 195-201. doi:10.1002/ags3.12226.
- Jones, D. R. (2014). Measuring midkine: The utility of midkine as a biomarker in cancer and other diseases. *British Journal of Pharmacology*, 171, 2925-2939. doi:10.1111/bph.12601.
- Muramatsu, T. (2011). Midkine: A promising molecule for drug development to treat diseases of the central nervous system. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 410-423. doi:10.2174/138161211795164167.
- Pathiraja, A., Marazziti, D., Cassano, G. B., Diamond, B. I. y Borison, R. L. (1995). Phenomenology and neurobiology of cocaine withdrawal: Are they related? *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 19, 1021-1034. doi:10.1016/0278-5846(95)00194-8.
- Salama, R. H., Muramatsu, H., Shimizu, E., Hashimoto, K., Ohgake, S., Watanabe, H.,... Muramatsu, T. (2005). Increased midkine levels in sera from patients with Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29, 611-616. doi:10.1016/j.pnpbp.2005.01.018.
- Salaru, D. L., Albert, C., Königsmark, U., Brandt, S., Halloul, Z., Heller, A.,... Mertens, P. R. Serum levels for midkine, a heparin-binding growth factor, inversely correlate with angiotensin and endothelin receptor autoantibody titers in patients with macroangiopathy. *International Angiology*, 33, 372-378.
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Salama, R. H., Watanabe, H., Komatsu, N., Okamura, N.,... Iyo, M. (2003). Two clusters of serum midkine levels in drug-naive patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters*, 344, 95-98. doi:10.1016/s0304-3940(03)00443-9.
- Sorrelle, N., Dominguez, A. T. A. y Brekken, R. A. (2017). From top to bottom: Midkine and pleiotrophin as emerging players in immune regulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 102, 277-286. doi:10.1189/jlb.3MR1116-475R.
- Torrens, M., Serrano, D., Astals, M., Pérez-Domínguez, G. y Martín-Santos, R. (2004). Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: Validity of the Spanish versions of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders and the Structured Clinical Interview for DSM-IV. *American Journal of Psychiatry*, 161, 1231-1237. doi:10.1176/appi.ajp.161.7.1231.

