



# RANF

An. R. Acad. Nac. Farm.  
Vol. 78 N<sup>o</sup> 3 2012  
ISSN 1697-4271  
Publicación electrónica  
trimestral

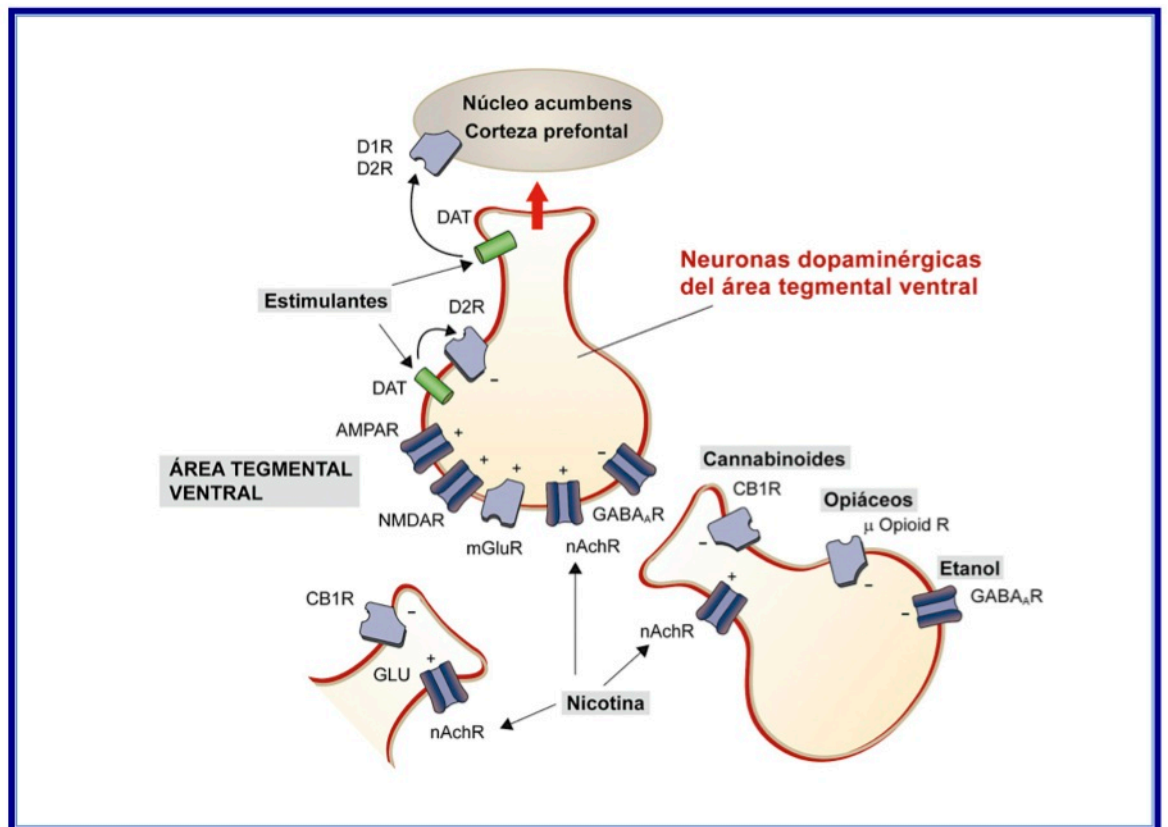


Imagen de portada:

Interacción de vías de neurotransmisión. Concurrencia de contactos sinápticos de vías glutamatérgicas y GABAérgicas con neuronas dopaminérgicas del área tegmental central.



### La próxima monografía de la Real Academia Nacional de Farmacia, testimonio de la ciencia biomédica en España



Ana Mª Pascual-Leone Pascual

Académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Editora de la monografía

Recibido el 10 de septiembre de 2012

e-mail: [edicion@ranf.com](mailto:edicion@ranf.com)

---

Esta obra recoge veinte testimonios de investigadores científicos españoles, en la vertiente biomédica, diez y ocho de los cuales realizaron su trabajo en la postguerra civil, y dos de ellos actualmente.

Entre los autores, han testimoniado eminentes científicos y profesores universitarios que fueron claves, en diferentes vertientes, en el desarrollo científico biomédico en España como los Dres. Segovia de Arana, Rodríguez Villanueva, Gertrudis de la Fuente, Fernández de Heredia, Mayor Zaragoza, Subirana, Sentandreu, Gabriela Morreale, Margarita Salas o Emilio Muñoz y, en general, todos los componentes del libro trabajaron en circunstancias muy duras y, con su cooperación y esfuerzo, lograron sentar las bases del nivel investigador actual. Sin su testimonio esta obra no hubiera podido realizarse, por ello les agradezco a todos, profundamente, su desinteresada colaboración.

El fin de esta publicación, es mostrar a la población española y a los poderes públicos, con vivencias y ejemplos reales, las características y dificultades especiales del trabajo de investigación. A la vez que destacar como, en etapas muy difíciles para nuestro país, fue posible tejer las redes necesarias para que la Investigación Española haya llegado, actualmente, en muchas vertientes, a niveles de excelencia internacionales. Está dedicado a "*todos los Investigadores Científicos españoles, de cualquier temática, que trabajaron en la postguerra civil*" ya que si bien "son todos los que están" es imposible abarcar a " todos los que son".

El libro, pues, trata de mostrar, con experiencias vividas, las características especiales de la investigación científica, en un momento en que los políticos, de cualquier tendencia, dada la crisis económica que padecemos, parecen volver sus expectativas a la investigación científica y a remodelar la economía del país hacia trabajos creativos propios del siglo XXI. Hacia el llamado I+D+i (investigación+desarrollo+innovación) cuyo basamento requiere una decidida

política de desarrollo de la investigación básica, extendida de forma global por toda la geografía española.

Por ello, esta obra pretende ser una ventana a la que asomarse para poder observar cómo en etapas muy difíciles de este país se tejieron las redes que nos han llevado a los niveles actuales de investigación. ¿Qué defectos se cometieron, ¿qué aciertos?, ¿cómo se hizo?, ¿qué piensan los que lo vivieron y trabajaron en ello? Parece que su testimonio puede ayudar y, en gran manera, ser decisivo para no cometer torpezas en el futuro.

Este libro muestra que en un país destruido por una guerra interna se pudo crear el germen de la investigación española, que hoy ha demostrado que puede llegar, muchas veces, a niveles de excelencia. El desarrollo alcanzado actualmente, está palpable en los últimos testimonios, puesto que están ordenados en el libro por orden descendente de la fecha de nacimiento de sus autores. Y en estos últimos testimonios se percibe, también, grandemente, el miedo, en los investigadores actuales, de que los recortes económicos acaben con el desarrollo logrado.

La investigación científica es un proceso lento, cuya interrupción puede llevar, rápidamente a un retroceso de nivel; el cual ha costado mucho esfuerzo e inversión económica alcanzar. También trasciende en los testimonios, la falta de conocimiento y amparo social que siempre ha tenido en España esta profesión, quizá por falta de tradición en ella.

En el libro, se pretende también hacer un homenaje a todos los investigadores y profesores universitarios que ya no existen y que nos guiaron y condujeron en nuestra vocación investigadora a todos los que testificamos en el libro.

Para concretar y centrar los fines y el interés de su contenido se ha realizado, una introducción y un epílogo; intentando, en este último, recopilar lo más fundamental de las reflexiones y sugerencias de cada capítulo.

El libro comprende una Presentación por la Excmá Sra. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal y un Prólogo escrito por el Prof. Federico Mayor Menéndez, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid y Presidente Electo de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), a quienes damos las gracias por ello. Su publicación, ha sido subvencionada, totalmente, por la Fundación Areces a la cual agradecemos profundamente su ayuda.



### **Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García**

**Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia**

Posiblemente, en este tercer trimestre de 2012, Colombia ha sido el país iberoamericano que más reuniones científicas y actividades farmacéuticas ha desarrollado. En agosto en Cartagena y en septiembre en Medellín.

El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos de Colombia ha celebrado sus 75 años “trabajando en pro de la profesión”, y ha unido su celebración con la Federación Farmacéutica Sudamericana (FEFAS) así como con la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología Cosmética.

Fruto de esta simbiosis, han tenido lugar en Cartagena de Indias tres congresos simultáneos con un denso programa de ámbito internacional. Su lema común ha sido “Diseñando el futuro: estrategia del mañana”, a fin de que los futuros colegas estén orgullosos de ser farmacéuticos.

Durante los días 16, 17 y 18 de agosto, se han reunido en la histórica ciudad numerosos profesionales y científicos farmacéuticos de Brasil, Suecia, Colombia, España, México, Paraguay, Argentina, Perú, Chile, Uruguay, Cuba, Ecuador, Venezuela, Paraguay y EE UU. La participación mayoritaria ha sido obviamente colombiana. Es también de agradecer el mecenazgo de 32 instituciones. Así, cabe destacar la participación de 16 conferenciantes internacionales y 8 colombianos, que junto con 61 posters de temas científicos, 34 de atención farmacéutica y 27 profesionales, han cubierto un amplio abanico de presentaciones que ha permitido mostrar la actualidad profesional en la Universidad, la industria farmacéutica, farmacia hospitalaria y comunitaria, así como en la gestión farmacéutica. Además, para relacionar estas actividades, se organizaron 5 mesas de debate, que permitió discutir, en un agradable ambiente internacional, numerosos temas de actualidad farmacéutica. Los ponentes en forma de panel, se disputaron 8 premios, bien dotados económicamente, la mitad de ellos reservados para temas de atención farmacéutica.

Previo al XV Congreso de FEFAS, tuvieron lugar 2 cursos, uno de “Mentes creativas” y otro a base de conferencias magistrales de “Oncología farmacéutica” (El cáncer como problema de salud, Diagnóstico diferencial del cáncer, Farmacoterapia del paciente –Antineoplásicos, Terapia hormonal, Inhibidores específicos, Anticuerpos, Modificadores de la respuesta biológica-, Impacto de la evaluación de la seguridad en el paciente, Seguridad de las terapias con radionúclidos, Seguimiento y seguridad de la farmacoterapia de apoyo, Tratamiento del dolor y de la emesis.

En su conjunto, se debe destacar el “Foro de Política Farmacéutica en las Américas”, en que diversas autoridades de Colombia (Dirección General de Medicamentos y Tecnologías en Salud), Brasil (Asistencia Farmacéutica, Ministerio de Salud) y Suecia (Instituto Karolinska, de Estocolmo), aportaron su experiencia y presentaron nuevas líneas de actuación futura.

La principal participación española, en las diferentes conferencias, se centró en temas de Innovación Farmacéutica y Productos Naturales (Universidad de Salamanca), Retos del Farmacéutico Comunitario (Universidad de Granada) y La Historia de la Farmacia, una disciplina cargada de futuro (UCM).

Igualmente, fueron muy valiosas las presentaciones de la actual Presidenta de la Federación Farmacéutica Sudamericana y del anterior Presidente de la FIP.

El “Foro de Tecnologías en Salud”, presentó importantes trabajos de Colombia, EE UU y Banco Interamericano de Desarrollo.

Asimismo, por parte de la Organización Panamericana de Salud (OPS), se aportó un sugerente “Perfil Farmacéutico Mundial”.

El último día, se desarrolló el “Foro de Atención Primaria en Salud en Latinoamérica”, con especiales aportaciones de Costa Rica, Brasil y OPS. También se expuso por parte de Colombia su “Centro de Información de Medicamentos”. Igualmente, se presentó un interesante trabajo mexicano sobre “Las buenas prácticas de manufactura – Norma 059 vs FDA”.

El “Foro de Estrategias Gerenciales del Farmacéutico” fue liderado por profesionales de Paraguay y Colombia.

Es digno de reseñar, las interesantes conferencias del Secretario de Relacionales Interinstitucionales de la FIP sobre “Falsificación Farmacéutica” y por parte colombiana sobre el “Uso Racional de Medicamento en las Américas”. Por Argentina, se expuso un interesante trabajo sobre “Neuromarketing farmacéutico”.

Diversos trabajos sobre micropartículas, nanopartículas, sistemas de liberación liposomal y estudios de biodisponibilidad fueron presentados por

docentes universitarios bogotanos. Igualmente las aportaciones farmacognósticas y fisicoquímicas fueron de indudable valor científico.

Mención especial debe hacerse de la conferencia magistral sobre “Validación de sistemas computacionales”, brillante aportación mexicana.

También considero dignos de resaltar los trabajos sobre la “Vigilancia intensiva del Hospital Universitario de Uruguay”, el proyecto ecuatoriano de “Atención Farmacéutica para pacientes hipertensos crónicos” y el “Impacto económico y en la salud del tratamiento antirretroviral para el VIH/SIDA con medicamentos nacionales en Cuba”. Otro tanto se ha de decir del trabajo realizado en la Universidad Nacional de Colombia, sobre “Citotoxicidad y actividad leishmanicida”, así como los trabajos chilenos del Centro de Atención Primaria de Salud Familiar, sobre permanencia de inventarios de farmacia asistencial.

La numerosa aportación colombiana, no dejó de lado temas profesionales tales como “Perfil ocupacional y salarial de los farmacéuticos graduados en la última década”, los “Sistemas de Regulación de Precios de Medicamentos”, “La atención farmacéutica en pacientes diabéticos” “Caracterización de sistemas coralinos”, “Antivenenos”, “Compuestos naturales con actividad antiplasmódica” o “Modelos antitumorales in vitro”.

Del largo centenar de trabajos presentados a este congreso, la revista “Farmacia Sudamericana”, órgano de difusión de FEFAS, ha seleccionado 10 artículos que han visto la luz recientemente, junto con las palabras de presentación de la Presidenta de la Federación y del Presidente del Congreso.

Los trabajos elegidos son:

1.- “Servicios Farmacéuticos basados en Atención Primaria de la Salud (APS): del Medicamento a las personas”, elaborado por la Asesora Regional de Políticas Farmacéuticas de la OPS/OMS, de Washington. Establece una propuesta de cambio de paradigma que beneficia a la población y es una oportunidad para el desarrollo del profesional farmacéutico.

2.- “Foro Farmacéutico de las Américas: Promoviendo el cambio en los Servicios Farmacéuticos en las Américas”. Este organismo, creado en el año 2000, fue precedido por el de Europa (1992) y seguido de los del Sudeste Asiático (2001), Pacífico Occidental (2001), Mediterráneo Este (2002) y África (2004), propiciados por la OMS y la FIP. El común denominador de todos ellos es la mejora de la salud, mediante el desarrollo y perfeccionamiento del ejercicio profesional farmacéutico, fortaleciendo la práctica farmacéutica a través de la promoción y coordinación de actividades y proyectos en las diversas políticas nacionales de salud pública. En la actualidad el Foro de las Américas, viene trabajando



activamente en un modelo específico, organizando grupos técnicos de educación farmacéutica.

3.- “El Control de Químicos y Precursores de Drogas Ilegales”. La fiscalización. Las Naciones Unidas y las Convenciones (1961, 1971, 1988). La problemática en Suramérica. La Unión Europea y la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. El Proyecto Regional para la Prevención del Desvío de Sustancias Precursoras de Drogas en los Países de América Latina y el Caribe (Perú, México, Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Panamá, Trinidad y Tobago, Venezuela y Jamaica). El Sector empresarial y su rol en la prevención, protección y control en las empresas. Cooperación en la fiscalización. Propuesta del concepto de responsabilidad compartida y responsabilidad social.

4.- “La Farmacopea Argentina y el Proceso de Armonización Regional como herramienta de calidad”. Consenso para la construcción de la Farmacopea Regional (Argentina, Brasil, Uruguay y Paraguay); Política de medicamentos, contenidos de la Farmacopea, selección de ensayos y metodología de análisis de medicamentos y productos sanitarios. Desarrollo de Sustancias de Referencia.- Ingredientes Farmacéuticos Activos, Vacunas, Hemoderivados, Productos Biológicos, Drogas Vegetales y Productos Radiofarmacéuticos.

5.- “La Farmacopea Argentina en pos de la creación de la Farmacopea Mercosur”. Según su Secretaría Técnica y la Dirección Ejecutiva, se afirma que la Farmacopea no debe de ser estática sino que debe mantener un continuo estado de actualización, convirtiéndose en un tratado que construye calidad, de la mano de los adelantos tecnológicos en constante revisión”. Esta iniciativa se viene desarrollando desde 2008 con continuas reuniones, que han alcanzado, en agosto de 2011, sustanciosos avances, que se están plasmando en la actualidad.

6.- “Productos Biológicos: Tecnología Diversa, Estado y Perspectiva Global”. Producción de biológicos. Biofábricas. Biosensores. Oligoterapia. Terapias Epigenéticas.

7.- “Biofármacos en Chile, Requisitos Regulatorios y Farmacopeicos para el Registro, la Comercialización y la Farmacovigilancia”.- Aspectos regulatorios. Propuesta normativa. Calidad: requisitos y especificaciones. Riesgos. Ensayos preclínicos y clínicos.

8.- “Anticuerpos monoclonales: Bases, Desarrollo y Aplicaciones”. Desarrollo y evolución de los anticuerpos monoclonales. Sistemas de producción. Usos y mercados. Regulación. Estrategias genéticas.

9.- “Consideraciones ante la decisión de ser Empresario Farmacéutico”.- Sobre el empresario: Preparación académica. Acumulación de experiencia. Definición del tipo de empresa y sector. Sobre la empresa: La integralidad. El



talento humano. Orden. Asesoramiento. El servicio al cliente. La gradualidad. Sobre los socios y entorno: Aprovechamiento de las oportunidades. Asociación. Conocimiento del entorno. Alianzas estratégicas. Sobre la ubicación en el mercado: Reiniciación de productos a vender. Diferenciación. Posicionamiento. Aspectos regulatorios. Sobre la credibilidad: Excelentes relaciones y cercanía con los farmacéuticos.

10.- “La Crisis Global de la Salud y la Profesión Farmacéutica”. Reformas en salud finalizando el siglo XX. La Organización Mundial del Comercio. Sistemas de Salud: avances o retrocesos. Actualidad: de nuevo reformas. Sobre las crisis. Retos profesionales.

En la última decena de septiembre se ha desarrollado en la Universidad de Antioquia, en Medellín (Colombia) un magno acontecimiento profesional y académico, en los ámbitos de la Farmacia y la Alimentación, promovido por las autoridades académicas de esta prestigiosa Universidad pública y la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia (COIFFA), a través de su Comisión Permanente, con la activa participación de varios Académicos de la RANF.

El 24 y 25 de septiembre en la Universidad de Cartagena (Colombia), los Profesores Ortega Ortiz de Apodaca, García Asuero y quien suscribe, participaron en una reunión de “Telefarmacia y telemedicina”, organizada por el Prof. Pomares, en que farmacéuticos colombianos, tanto del ámbito académico, hospitalario, comunitario y analítico-clínico, desarrollan un encomiable programa sanitario, fundamentalmente en áreas desasistidas, por el aislamiento social o geográfico. Gracias al uso de las telecomunicaciones y las tecnologías de la información, se ha logrado un eficiente sistema de atención primaria, evitando numerosos problemas relacionados con medicamentos.

Así pues, se ha optimizado la atención farmacéutica, sin la presencia física del farmacéutico y el médico, pero aportando innegables beneficios de salud al paciente. Esta visión de futuro surgió pujante tras el 70º Congreso de la FIP.

Posteriormente, del 29 al 29 de septiembre, se celebró en la centenaria Universidad de Antioquia, en Medellín (Colombia), organizado por la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia (COIFFA), la Facultad de Química Farmacéutica y el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos de Colombia, coincidiendo con la XV Reunión de la Comisión Permanente de COIFFA, el I Simposio Internacional de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, cuyo lema ha sido “Identificando propuestas para la solución de problemas prioritarios en los sectores farmacéutico y alimentario, de cuya Comisión organizadora internacional formé parte.

Con una nutrida participación de congresistas de 14 países iberoamericanos, Alemania y EEUU, se han desarrollado cuatro conferencias plenarias de interés común para los sectores farmacéutico y alimentario, 4 mesas de debate específicas en los ejes temáticos definidos en cada uno de los sectores de la reunión, 1 mesa orientada a la formación farmacéutica y alimentaria y 11 presentaciones de trabajo de investigación seleccionados por el Comité Académico.

La reunión de COIFFA, fue dirigida por su Presidente, el Prof. José Morais, de la Universidad de Lisboa; se abordaron numerosos temas académicos y administrativos, así como la recepción de las actividades anuales de los distintos miembros y comisiones sectoriales, cronograma del trabajo para 2013-2015, etc.

Quien suscribe, presentó el trabajo desarrollado sobre armonización de terminología académica, científica y profesional farmacéutica, en los idiomas español y portugués (España, Argentina, México; Portugal, Brasil). Asimismo, se definió la programación de la próxima Asamblea General, a celebrar en Brasilia en junio de 2013, que estará centrado en la formación, innovación y servicios farmacéuticos. El último día de la reunión, se convocó una sesión extraordinaria para analizar el seguimiento de la futura reunión en Brasil.

Durante el día 26, en la sede de la Facultad de Química Farmacéutica y previo al Simposio, desarrollamos un curso, a cargo de los Doctores Agustín García Asuero (Universidad de Sevilla), Carlos Castaño (Universidad de Antioquia) y yo mismo sobre "Historia de la Química y de la Farmacia".

Los días siguientes fueron dedicados sucesivamente a mesas sobre "Producción, regulación y comercialización de productos biológicos y biotecnológicos", "Inmunogenicidad", "Comercialización de productos biotecnológicos para terapias celulares" y "Nuevos desarrollos en medicina personalizada.

En la primera jornada, también se dictó la conferencia plenaria titulada "Compuestos polifenólicos en la industria farmacéutica y alimentaria" (EE UU). Fue seguida de cuatro presentaciones colombianas sobre "Química computacional", "Tendencias y futuro en la investigación en polifenoles", "Uso de plantas como opción terapéutica en mordedura de serpientes" y "Química computacional en la identificación de principios activos".

El segundo día, se impartió la conferencia plenaria "La biotecnología como herramienta en el sector alimentario y farmacéutico" (UN, Colombia). A continuación se presentaron tres avances sobre "Liberación modificada basada en sistemas portadores de fármacos (UNC, Argentina), "Microalgas cultivadas en biorreactores con fuente de compuestos bioactivos de interés farmacéutico y alimentario" y "Nanotubos de carbono como vectores específicos, una opción

viable para el tratamiento del cáncer”, ambas aportaciones de la Universidad de Antioquia.

La mesa sobre “Diseño y desarrollo de medicamentos”, contó con cuatro importantes presentaciones: “Sistemas innovadores aplicables al desarrollo de medicamentos” (UN Córdoba, Argentina), “Diseño de formas de dosificación “ (UA, Colombia), “Desarrollo de medicamentos para registro sanitario en Europa (Universidad de Coimbra, Portugal) y “Biofarmacia y diseño de medicamentos” (Universidad de Valencia, España).

Seguidamente se pronunció la conferencia plenaria titulada “Reología en el diseño de un suplemento nutricional para enfermos disfágicos” (Alemania). A continuación se presentaron tres trabajos sobre “Propiedad intelectual y sistema de patentes en el sector farmacéutico” (UNAM, México), “Características fisicoquímicas de las aguas envasadas y su influencia en la salud” (ULA, Venezuela) y “Vida útil de alimentos funcionales” (UA, Colombia).

Mas tarde, concluyó la jornada con una mesa de debate, moderada por el director del departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, sobre “Educación farmacéutica y alimentaria”, en la que se presentaron tres interesantes ponencias: “Programa curricular de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia: una respuesta a los requisitos de formación en Colombia”, “Formación y perfil profesional del Ingeniero de Alimentos en Latinoamérica” (UTFD, Chile) y “Directrices de COIFFA en la formación y perfil profesional del farmacéutica (UAM-X, México).

El último día principió con la mesa sobre “Utilización adecuada de medicamentos”, con los trabajos sobre “Utilización de indicadores en programas de atención farmacéutica” (Universidad de Panamá), “Promoción del uso adecuado de los medicamentos en Latinoamérica” (UPAGU, Perú), “Papel del farmacéutico en el uso adecuado de medicamentos” (Universidad de Puerto Rico) y “Papel del farmacéutico en la prevención y control del dolor en enfermedades crónicas (Universidad de Panamá).

También fueron presentados dos avances fueron sobre: “Importancia de la vida útil sensorial en el desarrollo de un alimento funcional” (UA, Colombia) y “Evaluaciones de tecnologías sanitarias como herramienta para mejorar la eficiencia de los sistemas de salud en Latinoamérica” (UCV, Venezuela). La conferencia de clausura fue un brillante broche sobre “Innovación como herramienta para la competitividad de tiempos de cambio” (UVG, Guatemala).

Las cuatro mesas de debate en el sector alimentario fueron también muy variadas e interesantes. La primera sobre “Nanotecnología y su aplicación en alimentos”, contó con tres sugerentes exposiciones: “Nanocompuestos de fuentes

naturales o sintéticas para uso en alimentos y otras aplicaciones” (UA, Colombia), “Inspección de la maduración de frutos por análisis nano-estructural” (UI, Colombia) y “Aplicaciones de la nanotecnología en alimentos: estado actual y perspectivas” (ULS, Colombia). La segunda se centró en “Los compuestos bioactivos de interés alimentario”, con aportaciones sobre “Antioxidantes en frutas colombianas” (UA, Colombia), “Alimentos funcionales y salud: el caso de los fitoesteroles”, (Universidad de Coimbra) y “Diseño de alimentos funcionales” (UA, Colombia). La tercera mesa contó con cuatro conferenciantes: “Tecnologías emergentes en la transformación de alimentos” (UTFS, Chile), “La transformación de alimentos y el cambio en sus propiedades termo-físicas” (UT, Colombia), “Método de impregnación al vacío” (UN, Colombia) y “Efectos del procesamiento de alimentos en los compuestos polifenoles” (UO, EEUU). La última tuvo como lema la “Globalización Alimentaria: Un reto para todos”, con presentaciones sobre “Tendencias en la investigación de alimentos funcionales (CINSB, Colombia), “Protocolos de declaración de salud en alimentos” (IPF, Colombia), “Microorganismos viables no cultivables y su impacto en la transmisión de enfermedades de origen alimentario” (ULA, Venezuela), “Seguridad alimentaria y estándares de calidad, en términos de la Unión Europea” (GASA, Colombia) y “Transculturización alimentaria y su efecto en la nutrición de comunidades vulnerables (Uch, México).

Finalmente, deseo concluir esta exposición recogiendo un singular mensaje que he recibido de un entrañable colega peruano, que a continuación transcribo.

### **HIMNO FARMACÉUTICO DEL PERÚ**

*Antigua profesión, como la humanidad  
es la Farmacia digna Ciencia,  
Arte y Técnica de la preparación  
y administración de medicinas para toda  
curación.*

*Abnegada y valiosa profesión social  
su influencia en la industria es sin duda  
promotora unidad de desarrollo  
eficiente en el control de producción final.*

*En la esfera de la investigación  
es también importante elemento vital.*

*Todos somos farmacéuticos dignos,  
Laboramos con gran pundonor.*

*¡Vamos colegas a triunfar! En nuestra honrosa profesión*

*del cumplimiento del deber precisa la comunidad.*

*A la Farmacia Nacional perfeccionemos sin cesar*

*A trabajar, por nuestro ideal de engrandecer*

*nuestro Perú.*

*Profesión de innegable proyección mundial.*

*Los tres reinos de la naturaleza*

*proporcionan los recursos necesarios*

*permitiendo el crecimiento económico.*

*Profesión tan humana como no hay otra igual*

*paradigma de gran superación.*

*Nuestro gremio orgulloso le ofrece*

*su promesa de gran unidad*

*¡Vamos colegas a triunfar!*





### Antonio L. Doadrio Villarejo

Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia  
e-mail: [edicion@ranf.com](mailto:edicion@ranf.com)

---

Debido al parón veraniego, no ha habido actividad académica durante los meses de julio y agosto. Reanudadas éstas, el mes de septiembre tuvimos tres sesiones solemnes de tomas de posesión de Académicos Correspondientes, las de los Dres. Francisco Bolás Fernández, Eduardo Costas Costas y Cecilio Giménez Martín, realizadas el 13, 20 y 27, respectivamente.

Francisco Bolás, Catedrático de Parasitología en la Facultad de Farmacia de la UCM, fue presentado por el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Vicepresidente de la Corporación, que además es su maestro. Su *laudatio* estuvo mediatizada por este hecho, dándonos una bella lección de la correspondencia entre maestro y discípulo, relatada con emoción y orgullo de quien es su hijo científico. El Dr. Bolás, pronunció su discurso titulado: "Trichinella y el músculo esquelético: paradigma del parasitismo".

El género *Trichinella* representa un linaje monofilético dentro de la superfamilia Trichinelloidea, cuyos ancestros alcanzaron el parasitismo probablemente en el Paleozoico. La superfamilia, se define filogenéticamente por la presencia del esticosoma, una región especializada del esófago glandular, que junto con las glándulas bacilares constituyen estructuras exclusivas de este grupo de nematodos.

Otra particularidad diagnóstica, es la posesión de un ciclo biológico parasitario que transcurre enteramente en el interior de un único hospedador vertebrado (autoheteroxeno), con desarrollo y establecimiento de estados adultos en la mucosa intestinal e implantación sucesiva de larvas de primer estado (L-1) en el tejido muscular esquelético, bien protegidas por una cápsula de colágeno generada en torno a ellas o en ausencia de la misma. Su transmisión zoonótica está asegurada por el carroñerismo y la depredación, garantizando así su éxito adaptativo.

Actualmente, el género está representado por 12 genotipos, de los cuales 8 ostentan rango de especie, circulando en mamíferos, aves y reptiles, en las diversas



áreas zoogeográficas del planeta. Dentro del hospedador, el embrión recién nacido de *Trichinella* muestra una selectividad exclusiva por el músculo esquelético al que accede desde el torrente circulatorio y en el que penetra activamente para luego crecer hasta llegar a L-1 y establecerse, a la vez que inducir profundos cambios estructurales y fisiológicos que determinan la transformación de la fibra muscular en una nueva entidad independiente denominada "célula nodriza" que, a modo de placenta, se encargará de nutrir y detoxificar a la larva L-1 instalada en este nicho hasta su transmisión al siguiente hospedador.

El Ilmo. Sr. D. Eduardo Costas Costas, Catedrático de Genética en la Facultad de Veterinaria de la UCM, fue entronizado por la Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, Presidente de la RANF, quien con su gracejo gallego característico nos hizo un simpática, a la vez que profunda, presentación del recipiendario, al que alabó como uno de los mejores científicos de este país. Eduardo Costas, nos habló de: "Océanos, clima, energía y fitoplacton en tiempos de crisis".

Vivimos en una época de cambio global brusco (el Antropoceno), inmersos en una crisis planetaria: pérdida de biodiversidad, cambio climático, contaminación, agotamiento de recursos... Y en buena medida es una crisis por falta de conocimientos.

La Tierra, es el único planeta conocido que tiene la mayoría de su superficie cubierta por océanos de agua líquida. Durante los primeros 1.500 millones de años, las arqueobacterias oceánicas liberaron ingentes cantidades de metano a la atmósfera. Pero hace 3.000 millones de años, apareció el fitoplancton, descubriendo la fotosíntesis con liberación de O<sub>2</sub>. El O<sub>2</sub> terminó acumulándose en la atmósfera y surgió el Planeta Azul que conocemos. Desde entonces, el fitoplancton ha sido vital controlando el balance energético y climático de la Tierra.

En su larga historia, el fitoplancton se enfrentó a grandes desafíos (p.ej. las 6 grandes extinciones que asolaron el Planeta), siendo capaces de superarlos en el mayor ejemplo de éxito evolutivo, como al principio del proterozoico en que una glaciación global afectó al Planeta (el hielo llegó al Ecuador y todo el océano quedo congelado). Sin embargo, el fitoplancton sobrevivió en fuentes termales que actuaron como "arcas de Noé", pese a las condiciones extremas de dichas fuentes (pH≈2, metales pesados, elevadas temperaturas...), o también, durante el Pérmico cuando una pluma de manto generó una actividad volcánica extraordinaria produciendo la desaparición del 96% de las especies marinas; el fitoplancton también se adaptó sin problemas. Hoy en día, se adaptan exitosamente a ambientes naturales extremos (como el de Río Tinto), a contaminantes antropogénicos (herbicidas, petróleo, actividad minera...) y al calentamiento global.

Sin embargo, la adaptación de las microalgas está cambiando nuestras ideas preconcebidas. Se asume que la adaptación a ambientes extremos es un proceso gradual y lento que origina organismos extremófilos. Pero en los organismos fitoplanctónicos no es así, se adaptan muy rápido como consecuencia de mutaciones que aparecen espontáneamente antes de la exposición al ambiente extremo. Posteriormente, ya en el ambiente extremo, la selección de nuevas mutaciones les permiten una adaptación mas eficiente. Sus peculiares características poblacionales (organismos haploides, reproducción asexual, poblaciones ingentes, tasa de mutación muy elevadas...) aseguran la aparición de resistentes.

También desde un punto de vista aplicado, estos organismos pueden ser muy importantes para nuestro futuro porque sus peculiares características genéticas permiten usar microalgas en aplicaciones biotecnológicas punteras (biosensores, biorremediación, bioacumulación de sustancias de interés, biocombustibles...) que podrían mitigar la crisis.

Como anécdota, tal fue la repercusión de su discurso, que nuestro servidor sufrió una caída durante 1 hora, debido al gran número de visitas que tuvo su conferencia en diferido. Todo un éxito mediático.

Por último, el Ilmo. Sr. D. Cecilio Giménez Martín, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Ciencias de la UAM, también presentado por nuestra Presidente, disertará sobre: "Bases Moleculares de la Esquizofrenia".

La esquizofrenia es una enfermedad compleja que afecta a alrededor del 1% de la población mundial y constituye una de las más importantes causas de discapacidad crónica. Aunque su etiología es desconocida, la enfermedad implica diversas anomalías neuromorfológicas y neuroquímicas y se acepta que factores genéticos, bien solos o potenciados por factores ambientales y epigenéticos juegan un papel importante en su patogénesis. Numerosos estudios realizados durante los últimos cuarenta años, han relacionado a alteraciones en la neurotransmisión mediada por aminas biógenas, la neurotransmisión glutamatérgica y gabaérgica con la patología de las psicosis esquizofrénicas.

Recientemente, a través del conocimiento de genes se susceptibilidad así como de proteínas implicados en la patología de la enfermedad, están permitiendo un diagnóstico precoz de la misma y el desarrollo de una nueva generación de compuestos que puedan actuar como antipsicóticos de una forma más selectiva.

Por otra parte, destacaremos las declaraciones de nuestra Presidente, M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal al periódico El Mundo, durante los Cursos de Verano de la Universidad Complutense de Madrid en San Lorenzo de El Escorial. El contenido íntegro se puede leer en:

<http://www.elmundo.es/elmundosalud/2012/07/03/noticias/1341316115.html>

Además, el Académico de número Dr. Joan Guinovart Cirera, ha sido nombrado recientemente Presidente de la "International Union of Biochemistry and Molecular Biology". Tiene un gran significado para la ciencia española, pues se trata del segundo español Presidente de dicha Sociedad, de la que también lo fue el Premio Nobel Severo Ochoa.

Joan Guinovart, es Director General del "Parc Científic de Barcelona" y del "Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona, IRBB-PCB". Su actividad investigadora, está centrada en el metabolismo del glucógeno, con especial énfasis en el estudio de las alteraciones del metabolismo hepático de los carbohidratos en la diabetes. Fue galardonado con los premios: "Leandre Cervera" (1979 y 1985) y "August Pi i Sunyer" (1983) del "Institut d'Estudis Catalans"; el "Novo-Nordisk" en Investigación Diabetológica Básica de la "Sociedad Española de Diabetes" (1996), de Investigación Científica "Ciudad de Barcelona"(1998) y Premio "Conferencia PABMB", San Francisco, CA (1999). Está en posesión de la Medalla de la "Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire" (1998) y la Medalla "Narcís Monturiol" de la Generalidad de Cataluña al mérito científico y tecnológico (1999).

El Académico de número Dr. Víctor Jiménez Torres y su equipo, han sido galardonados con el Segundo Premio 2012 a la "Innovación en Farmacia Hospitalaria", promocionado por Laboratorios Janssen - Cilag.

Víctor Jiménez, es Catedrático de Biofarmacia y Farmacocinética de la Universidad de Valencia. Tiene cuatro líneas de investigación: la primera, es la referente a Nutrición Artificial. La segunda, se centra en el establecimiento de directrices farmacoterapéuticas a través de la Farmacocinética Clínica y Poblacional con objeto de diseñar pautas posológicas individualizadas (financiada con fondos FIS). La seguridad del paciente, desde la perspectiva de la Calidad Farmacoterapéutica se corresponde con la tercera línea, que ha exigido la implantación de diferentes herramientas metodológicas (financiada con Fondos Feder), como la aplicación de métodos de aprendizaje máquina (redes neuronales y aprendizaje reforzado pioneros a nivel internacional). La cuarta línea de investigación, se centra en la mejora de la utilización de fármacos antineoplásicos. Los pacientes con cáncer presentan una alta variabilidad en su respuesta y pequeñas variaciones en su perfil farmacocinético-farmacodinámico, bien por necesidad de reducción de dosis por toxicidad o cambios en su comportamiento, podría explicar el diferente resultado en los pacientes. El objetivo es alcanzar y mantener la máxima eficacia en todos los ciclos de tratamiento, a fin de lograr la remisión o el máximo tiempo libre de enfermedad.

Asimismo, se le ha concedido el Premio Méritos 2012 de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, que le será entregado en el 57º Congreso Nacional de la Especialidad, a celebrar del dos al cinco de octubre próximo en Bilbao.

Por último, el académico correspondiente Jesús Pintor Joust, ha sido nombrado miembro del Editorial Board de la revista científica "The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics".

JPTE es una publicación de la American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, fundada por John J. Abel en 1908 y es una de las más prestigiosas y antiguas revistas de farmacología. Su nombramiento, es un reconocimiento al excelente currículum científico y al desarrollo de una nueva farmacología ocular realizada por el Dr. Pintor.

---

Noticias completas en: <http://rss.ranf.com/index.php>

Sesiones en diferido en: <http://www.mediaranf.com/>





**José M. Ortiz Melón**

Editor científico

e-mail: [edicion@ranf.com](mailto:edicion@ranf.com)

---

### El Proyecto ENCODE y su trascendencia biomédica. Adaptado de *Science*, septiembre 7 (2012)

Cuando hace algunos años los investigadores secuenciaron el primer genoma humano, resultó una sorpresa comprobar, en primer lugar, que éste contenía muchos menos genes (codificantes de proteínas) de los esperados, en relación con su tamaño total. En segundo lugar, se encontró, que estos genes, se encontraban distribuidos (no concentrados) a lo largo de los 3000 millones de bases que constituye el DNA del genoma humano. Así pues, en lugar de los esperados 100.000 genes o más, se encontraron que solo había unos 35.000 e incluso este número se redujo posteriormente hasta unos 21.000. Entre ellos, se encontraban por tanto, millones de bases sin función aparente, y a este DNA sin función se le consideró como “DNA basura”.

Recientemente, la publicación en las revistas *Science* y *Nature* de los resultados iniciales de un proyecto que lleva ya 10 años de trabajos denominado ENCODE( Enciclopedia de Elementos de DNA) ha venido a revelar, que contrariamente a lo que se había pensado inicialmente, cerca de un 80% del genoma humano tienen una función importante, aunque no codifique proteínas.

Además de definir mejor las regiones codificantes de proteínas, las nuevas bases funcionales reveladas por ENCODE especifican sitios de interacción de proteínas con el genoma que influyen la actividad de los genes, tiras de RNA con miles de funciones desconocidas, o simplemente lugares en los que modificaciones químicas sirven para silenciar fragmentos de nuestros cromosomas.

Tal vez lo más importante de los datos proporcionados por el programa ENCODE, es que van a servir para clarificar factores de riesgo genéticos para una gran variedad de enfermedades y el ofrecer una mejor comprensión de la regulación y función de los genes.

En conjunto, el proyecto ENCODE ha revelado que la regulación genética es más compleja que lo que se había pensado inicialmente, y que está influenciada

---

por múltiples secuencias de DNA regulador, que se localizan unas veces cerca y otras lejos de cada gen, así como por cadenas de RNA no traducidas.

Durante los años 1990 varios investigadores habían llamado ya la atención, sobre la idea, de que el llamado “DNA basura” no era tal. Con la secuencia del genoma humano ya establecida, el Instituto de Investigación sobre el Genoma Humano de Bethesda (Maryland) decidió hace años investigar sobre cuanto de nuestro genoma, era en realidad basura y por tanto sin función. En el año 2003, se comenzó así el proyecto ENCODE en el que 35 grupos de investigación conectados entre sí, proyectaron analizar 44 regiones del genoma (30 millones de bases) como proyecto piloto. Esto significaba aproximadamente un 1% de todo el genoma. En el año 2007, el proyecto piloto reveló ya que mucha de esta secuencia de DNA era activa de alguna manera, y la cuestión que se planteó entonces era conocer si el resto del genoma se comportaba como ese 1%.

Desde entonces, grupos pertenecientes a 32 instituciones de investigación repartidas por todo el mundo, han generado miles de conjuntos de datos. Mientras que los estudios piloto se llevaron a cabo por medio de una técnica llamada de microarrays basada en la comparación para analizar muestras de DNA, la fase más amplia de la investigación ahora revelada se ha beneficiado de las nuevas tecnologías de secuenciación, que se han abaratado mucho, y han permitido avanzar más rápidamente en este proceso.

Debido a que las partes del genoma a estudiar difieren en diferentes tipos celulares, el proyecto necesitaba ser capaz de estudiar la función del DNA en muchos tipos de células y tejidos. Al principio, el objetivo se centró en el estudio del genoma de solo tres tipos de células. Una de ellas, es una línea de leucocitos inmadura, llamada GM12878 que se ha utilizado también en un proyecto paralelo llamado el “proyecto de los 1000 genomas” que tenía por objeto caracterizar las variaciones genéticas entre humanos. En segundo lugar, la célula K562 de leucemia, y en tercer lugar la célula madre embrionaria, h1-ESC.

A medida que el proyecto se iba desarrollando los costes de secuenciación se fueron abaratando de tal manera, que se hizo posible el incorporar la secuenciación de nuevas líneas celulares. Se añadió así la línea celular de cáncer hepático HepG2 y la famosa y tradicional línea cancerosa de laboratorio, HeLaS3, así como tejido de cordón umbilical. Finalmente, otros 140 tipos de células se estudiaron también aunque en menor grado de detalle.

En todas estas células los investigadores han examinado qué bases del DNA se transcriben en RNA y si estas cadenas de RNA se transcriben en proteínas, verificando los genes codificantes de proteínas ya conocidos previamente, y localizando con mayor precisión el comienzo, el final y la región codificante de cada gen. Esta nueva reconsideración de la capacidad codificante del genoma



humano arroja ahora la cifra de que 3% del genoma contiene genes que codifica proteínas. Otros 11.224 fragmentos de DNA se clasifican como “seudogenes”, es decir, genes que han funcionado como tales en algún momento de la evolución, pero que ya no están activos y sin embargo lo están en algunos tipos celulares o en algunos individuos.

El proyecto ENCODE ha revelado también el resultado de que hay muchos otros “genes” en los que el DNA codifica RNA pero este no se traduce en proteína como producto final. La gran sorpresa, es que 93% de las bases estudiadas son transcritas como RNA. En el genoma total, aproximadamente un 76% del mismo es transcrito en RNA. De todos estos RNA transcritos, 8800 tránscritos, se conocen como “pequeños RNAs” y 9900 como “largos RNAs” no codificante, y cada uno de ellos contiene aproximadamente 200 bases. Se ha llegado a conocer también, que varios de estos RNAs, se localizan en la célula en lugares determinados. Así, algunos se encuentran en el núcleo, otros en el nucleolo, otros en el citoplasma etc. A consecuencia de todo ello, algunos investigadores proponen que la unidad fundamental del genoma y por tanto la unidad básica de la herencia debe ser “el tránscrito”, es decir, los fragmentos de RNA y no el “gen”.

Otra manera de probar la funcionalidad del DNA es evaluar si secuencias de bases específicas están conservadas o no entre especies. Estudios previos habían mostrado que 5% del genoma humano esta conservado entre mamíferos. Algunas secuencias no conservadas entre humanos y otros mamíferos se han encontrado conservadas entre mucha gente, indicando, que un 4% adicional del genoma esta bajo selección, nuevamente, en el linaje humano, y algunas de estas regiones han podido ser relacionados con trazos distintivos de la especie humana.

Además de intervenir en el proceso de la transcripción, las bases del DNA funcionan en regulación genética a través de interacciones con factores de transcripción y otras proteínas. Diversos subprogramas han permitido localizar 3,9 millones de regiones donde los factores de transcripción se unen al genoma.

Asimismo, se ha revelado, que las nuevas regiones funcionales descubiertas solapan con bases específicas del DNA asociadas con mayor o menor frecuencia con enfermedades. Este trabajo demuestra pues, que se puede usar los datos de ENCODE para establecer nuevas hipótesis sobre la conexión entre genética y enfermedades. Así el laboratorio del Dr. Stamatoyananapoulus por ejemplo ha conseguido establecer una relación entre regiones reguladoras y sus genes específicos, localizando las variaciones en estas regiones reguladoras que incrementan riesgo de padecer una u otra enfermedad. Por ejemplo, el análisis apunta a dos tipos de células T como patogénicas en la enfermedad de Crohn, y el hecho, de que ambas están implicadas este trastorno inflamatorio del intestino.

Es de esperar que este tipo de correlaciones se pueda ir extendiendo a otras muchas enfermedades genéticamente complejas y con ello poder ir definiendo mejor los llamados factores de riesgo.



### Mª del Carmen Avendaño López

Académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia  
e-mail: [edicion@ranf.com](mailto:edicion@ranf.com)

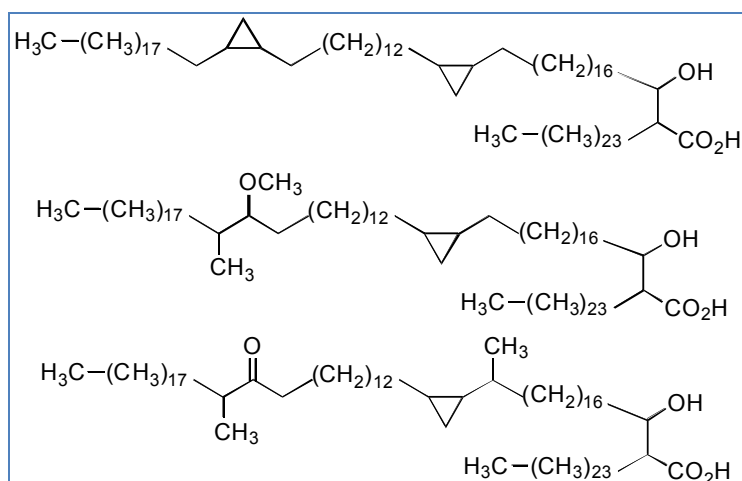
---

#### **“Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin-nature’s isoniazid”, Hartkoorn et al., *EMBO Mol. Med.*, 4, 1-11 (2012)**

La tuberculosis (TB), una enfermedad producida por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, ha producido a lo largo de la historia la muerte de millones de personas sin distinción de clase social. Antes de que apareciera la estreptomycin, el primer fármaco antituberculoso (1), el tratamiento de la TB consistía en el ingreso en un sanatorio a fin de descansar, tomar aire fresco, y seguir una buena dieta. La estreptomycin, se utilizó a partir de los años 1940 junto con ciertos fármacos de síntesis de baja actividad, como el ácido *p*-aminosalicílico (PAS) o las tiosemicarbazonas, pero pronto se observó que era demasiado tóxica y provocaba la aparición de cepas resistentes. Cuando en 1945, se descubrió que la nicotinamida era algo activa frente al bacilo tuberculoso (2), se empezaron a sintetizar estructuras análogas a esta vitamina, así como distintas tiosemicarbazonas. De este modo, surgieron la pirazinamida y las tiosemicarbazonas de piridina-3(ó 4)-carbaldehído. En el año 1952, se descubrió que un intermedio en la síntesis de estas últimas, la hidrazida del ácido isonicotínico (isoniazida, INH), era extraordinariamente activa y muy superior a los compuestos naturales o sintéticos utilizados anteriormente, siendo desde entonces un fármaco de primera línea para el tratamiento de esta enfermedad (3). A pesar de su sencilla estructura, el mecanismo por el que INH mata a *M. tuberculosis* ha sido controvertido debido a su complejidad, y su entendimiento ha requerido más de 50 años de estudios incluyendo el uso de herramientas genéticas (4).

Uno de los hallazgos más importantes en este sentido se produjo en 1970, cuando se descubrió que INH inhibe la biosíntesis de ácidos micólicos (5), componentes esenciales de la pared celular de las micobacterias. Estos ácidos poseen cadenas de 70 a 90 átomos de carbono en las que el grupo carboxilo se sitúa en un carbono secundario con un grupo hidroxilo en la posición  $\beta$  (Figura 1). La inhibición de su biosíntesis provoca la acumulación de ácidos grasos de cadena

larga y la muerte celular (6). En 1979, se observó que dicha inhibición afectaba a la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados de 24 y 26 átomos de carbono (7).

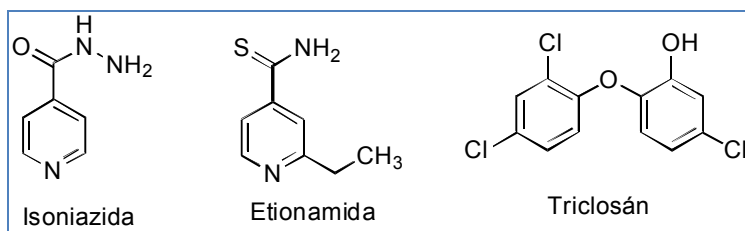


**Figura 1.-** Estructuras de algunos ácidos micólicos.

Paralelamente a estos hallazgos, se descubrió que INH es un profármaco que requiere la bioactivación por la enzima bacteriana KatG. Este descubrimiento comenzó en 1954 cuando se observó que la mayoría de las cepas resistentes a INH eran catalasa-inactivas (8). En 1973, se demostró que había un determinado gen que estaba implicado en la resistencia de los bacilos tuberculosos a INH (9), aunque no pudo identificarse por la ausencia de técnicas de secuenciación de ADN. Posteriormente, el desarrollo de mutantes reveló que es el gen *katK* el que transfiere la susceptibilidad a INH a las cepas de *M. tuberculosis* resistentes (10), y diferentes estudios bioquímicos demostraron que la catalasa-peroxidasa KatG codificada por dicho gen cataliza la conversión de Mn(II) en Mn(III) y éste es probablemente capaz de oxidar la isoniazida produciendo una serie de especies activas. Algunas de éstas, como el radical del ácido isonicotínico, son capaces de acilar diferentes compuestos (11, 12) a través de un mecanismo que ya se había sugerido en 1960 (13).

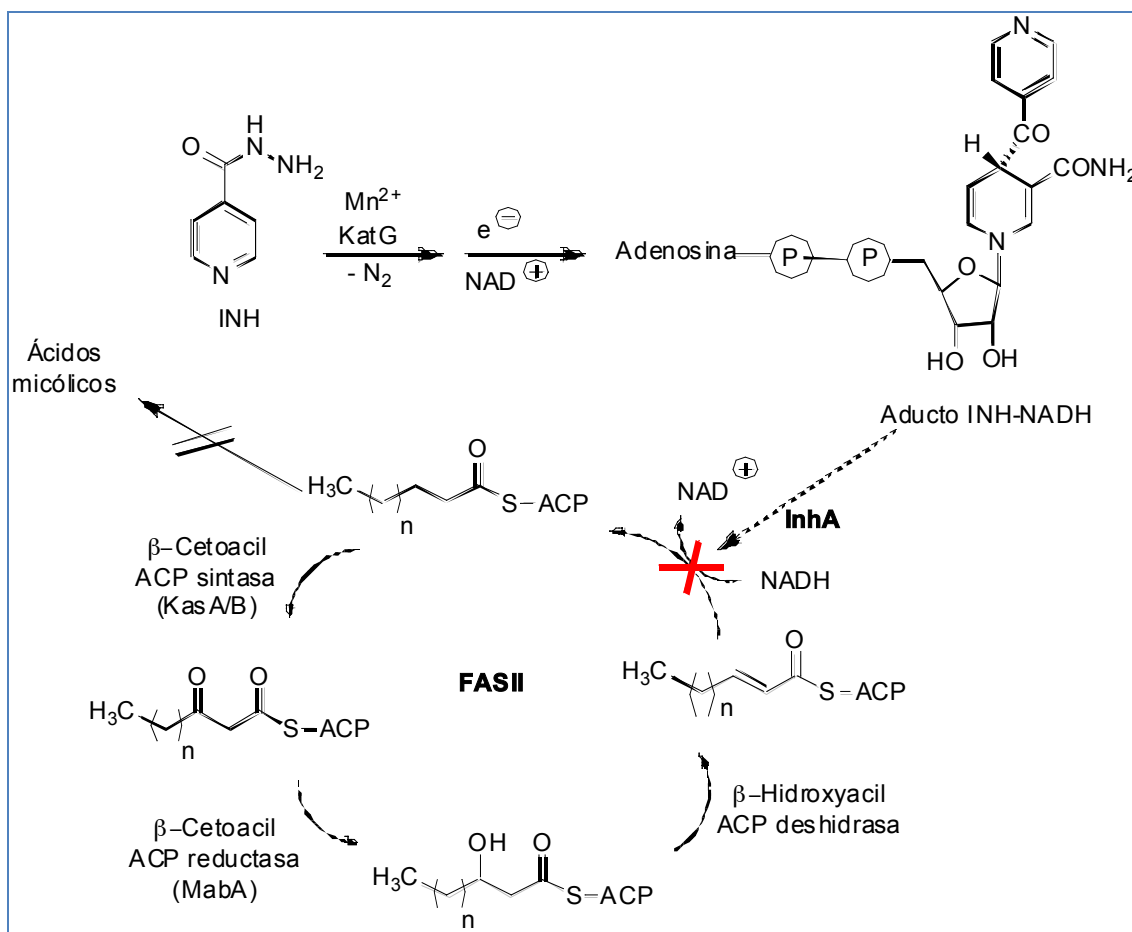
Por otra parte, en los años 60 se observó que los bacilos resistentes a INH lo eran también a etionamida (ETH), aunque no hubieran sido previamente tratados con ETH, y la semejanza estructural entre ambos sugirió que debían compartir la misma diana (14). Diversos experimentos con mutantes genéticamente caracterizados, confirmaron que el gen *inhA* codifica una diana común para INH y ETH, y que la mutación que causaba la sustitución de aminoácidos S94A es suficiente para producir la resistencia a ambos profármacos (15, 16). *InhA*, la enzima codificada por dicho gen, es una enoil-reductasa de la sintasa de ácidos

grasos tipo II (FASII) implicada en la biosíntesis de ácidos micólicos, y es también la diana de otro fármaco antituberculoso: el triclosán (17) (Figura 2).



**Figura 2.-** Compuestos inhibidores de la enzima InhA

La cristalización de InhA en presencia de INH, Mn<sup>2+</sup> y NADH, permitió descubrir que INH no es el ligando de la enzima InhA, sino que éste es el aducto covalente INH-NAD (18). En resumen, el mecanismo propuesto para INH comienza con la reacción catalizada por KatG y la formación de un hipotético radical acilo derivado del ácido isonicotínico que se enlaza a NAD (NAD<sup>+</sup> o NAD<sup>•</sup>), y el aducto resultante inhibe a la reductasa InhA (Figura 3).



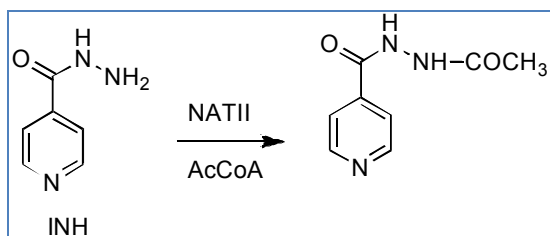
**Figura 3.-** Mecanismo propuesto para INH (ACP: acyl carrier protein).

Otra posible diana de INH, es la  $\beta$ -cetoacil ACP sintasa (KasA) (19), pero los datos bioquímicos y genéticos no apoyan esta propuesta. Por otra parte, se ha demostrado que la forma activa de INH, también forma con NADP<sup>+</sup> el aducto INH-NADP que inhibe la dihidrofolato reductasa (DHFR) de *M. tuberculosis* con una gran afinidad. Sin embargo, no se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *dhfr* confiera resistencia a INH en micobacterias (20). Tampoco se ha demostrado que la supuesta interacción con enzimas respiratorias de los radicales NO<sup>•</sup> que podrían originarse cuando INH se activa por KatG, sea responsable en parte de la actividad bactericida (21).

Tan controvertidos como los mecanismos para explicar la acción bactericida de INH sobre *M. tuberculosis*, son los propuestos para explicar las resistencias a este fármaco. En su mayoría, se asocian a mutaciones del gen *katG*, con la consiguiente pérdida de actividad de la enzima KatG y, por tanto, de la formación del aducto INH-NAD inhibitorio de InhA. De las más de 130 mutaciones de *katG* conocidas, la más común es la S315T. Otra mutación frecuente del gen *inhA* en cepas resistentes, es la S94A, que se localiza en el bolsillo de unión de InhA con NADH, reduciendo la afinidad entre la enzima y el cofactor. Datos cristalográficos de rayos X, indican que esta mutación distorsiona la red de enlaces de hidrógeno, por lo que el valor  $K_i$  para el aducto INH-NAD es mayor (22).

Otras mutaciones de la enzima InhA que afectan al lugar de unión del cofactor NADH, como son I21V, I47T, y S94A, producen un gran reducción en la afinidad de éste por la enzima pero influyen muy poco en la afinidad del aducto INH-NAD, lo que hace pensar que son poco importantes para la resistencia a INH. Ahora bien, como estos estudios se realizan con enzimas aisladas, es posible que las interacciones entre InhA y otras proteínas del *Mycobacterium* sean críticas para modular su actividad *in vivo*. Es un hecho, que varios componentes del proceso FAS-II se asocian entre sí y que la inhibición de InhA en sus mutantes produce cambios conformacionales significativos (23).

En varias cepas de laboratorio resistentes a INH, se han encontrado mutaciones en el gen *ndh* que codifica la NADH deshidrogenasa NdhII, de forma que el NADH acumulado compite con el aducto INH-NAD para interaccionar con la enzima InhA (24). Sin embargo, son raras las mutaciones de *ndh* encontradas en micobacterias resistentes aisladas en la clínica. En éstas, se han encontrado además de los ya mencionados, algunos mecanismos de resistencia asociados a mutaciones *katG* como las que afectan al gen *kasA* y a la sobreexpresión de la enzima *N*-acetiltransferasa (Nat), que cataliza la *N*-acetilación de INH impidiendo su activación por KatG (Figura 4).



**Figura 4.-** N-acetilación de INH.

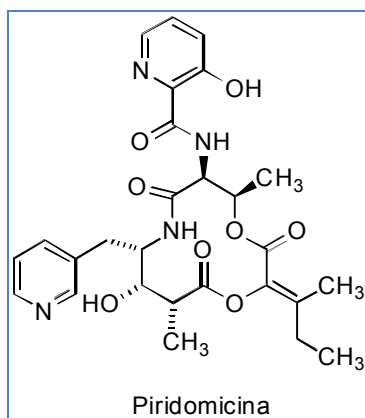
Como vemos, los estudios genéticos y bioquímicos y la cristalografía de rayos X han permitido disponer de un modelo que permite comprender la actividad y las resistencias de INH frente a *M. tuberculosis*. Desde el punto de vista práctico hay un hecho claro: puesto que la gran mayoría de las cepas resistentes a INH poseen mutaciones en la enzima KatG, serían deseables fármacos que no requieran ser bioactivados por esta enzima. Sin embargo, todos estos datos no han aportado mucho al diseño de nuevos fármacos activos frente a las cepas resistentes a INH, y la tuberculosis se está convirtiendo en una enfermedad intratable. De ahí la trascendencia mediática que está teniendo la noticia que nos ocupa, ya que en ella se demuestra que el antibiótico piridomicina es activo frente a muchos tipos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes al tratamiento con INH (25).

Este hallazgo, podría aliviar en un futuro la acuciante necesidad de nuevos fármacos para los enfermos tuberculosos infectados con cepas que se han hecho resistentes a múltiples fármacos (MDRTB), y en especial a los fármacos hasta hace poco tiempo más efectivos: isoniazida y rifampicina (un inhibidor de polimerasas de ARN), en los que la mortalidad se aproxima al 100%. Estas circunstancias, junto a la larga duración de los tratamientos y la susceptibilidad de los individuos VIH-positivos, justifica que el número de muertes al año debidas a la tuberculosis sea actualmente superior a dos millones (26).

### ¿UN NUEVO FÁRMACO ANTITUBERCULOSO?

En realidad, la piridomicina y su actividad frente a diferentes micobacterias incluyendo *M. tuberculosis* se conocen desde que se aisló de *Streptomyces pyridomiceticus* en 1953 (27). Posteriormente, se aisló también de *Dactylosporangium fulvum* (28). Es un ciclodepsipéptido de 12 eslabones que contiene fragmentos de N-3-hidroxicicolinil-L-treonina, 3-(3-piridil)-L-alanina, ácido propiónico, y ácido 2-hidroxi-3-metilpent-2-enoico (Figura 5).





**Figura 5.** Estructura del antibiótico piridomicina.

De los estudios realizados acerca de su biosíntesis, destaca uno reciente en el que se ha clonado y caracterizado el clúster que codifica las enzimas que lo biosintetizan en *Streptomyces pyridomyceticus* (NRRL B-2517): poliquétido sintetasas (PKS) y péptido sintetasas no-ribosómicas (NRPS). Sin embargo, su mecanismo de acción y su eficacia frente a *M. tuberculosis* no se habían establecido previamente, aunque su escasa o nula actividad frente otras bacterias Gram-positivas y Gram-negativas sugería que la diana de la piridomicina es un componente de las micobacterias que es muy diferente o está ausente en otros géneros.

La publicación que nos ocupa, ha utilizado el antibiótico producido por *Dactylosporangium fulvum* (NRRL B-16292) debido a la baja producción obtenida a partir de *Streptomyces pyridomyceticus* (NRRL B-2517), corroborándose primero su baja toxicidad en diferentes líneas celulares humanas y estableciéndose la susceptibilidad de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. smegmatis*, así como su capacidad para penetrar en los macrófagos y detener la replicación bacteriana.

Para identificar su diana terapéutica, se seleccionó y desarrolló a partir de la cepa H37Rv, un mutante resistente a piridomicina y sensible a isoniazida, moxifloxacina y rifampicina: la cepa PYR7. Cuando se secuenciaron casi por completo los genomas de ambas cepas y se comprobó la correspondencia del de la cepa original con el genoma de referencia para H37Rv (30), se compararon los genomas de la cepa salvaje y la resistente. De los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) encontrados, se desecharon los que correspondían a familias multigénicas o a sinónimos (que no alteran la naturaleza del aminoácido que codifican). Así quedó una mutación del gen *inhA* que supone la sustitución del ácido aspártico en la posición 148 de *InhA* por glicina (D148G), hecho que se corroboró por el clásico método de secuenciación de Sanger. Hay que mencionar,

que según varias publicaciones acerca de esta enzima, el aminoácido Asp148 se localiza cerca del bolsillo al que se enlaza el cofactor NADH.

La enzima InhA, se validó como diana de la piridomicina genéticamente, transformando la cepa H37Rv con un plásmido portador del gen *inhA* a fin de comprobar que la sobreexpresión de este gen en la cepa salvaje de *M. tuberculosis* provoca resistencia al antibiótico. Todos los datos obtenidos en éste y otros experimentos, corroboraron que la mutación D148G de la enzima InhA es la responsable de la resistencia a piridomicina y de la disminución de afinidad del cofactor NADH, sin afectar a la actividad de isoniazida e isotiazida.

Puesto que piridomicina e isoniazida tienen la misma diana, se hizo necesario estudiar si los bacilos resistentes a INH procedentes de la clínica retenían la susceptibilidad frente a piridomicina. Ya se ha dicho, que las mutaciones más frecuentes asociadas a las resistencias a INH se encuentran en el gen *katG* que cataliza la catalasa-peroxidasa requerida para su bioactivación, observándose con menor frecuencia mutaciones en la región promotora del gen *inhA* que aumentan la expresión de la diana. De las ocho muestras resistentes a INH analizadas en este estudio, cuatro presentaron mutaciones en el gen *katG* (S315T), tres en la región promotora de *inhA*, y en una se encontraron ambas. La susceptibilidad a moxifloxacin fue semejante en todas las cepas, incluida la salvaje. Las cuatro con mutaciones en *katG* mostraron, en comparación con la cepa H37Rv, una gran resistencia a INH pero ninguna resistencia a piridomicina, mientras que la mutación en el promotor *inhA* produjo una resistencia intermedia a INH y un aumento en la resistencia a piridomicina. Así pues, los mutantes *katG* (S315T), que son los que producen con mayor frecuencia resistencias a INH retienen totalmente la sensibilidad frente a piridomicina. También se ha demostrado en este trabajo que este antibiótico es un fármaco que no requiere ser bioactivado, y que la inhibición de InhA que origina tiene las mismas consecuencias bioquímicas que produce INH: la reducción de la síntesis de ácidos micólicos.

En resumen, la cepa resistente PYR7 con la mutación D148G en InhA, no muestra resistencia cruzada a isoniazida ni a etionamida mientras que, por el contrario, la mutación S94A responsable de la resistencia a isoniazida mantiene la sensibilidad a la piridomicina. Esto sugiere que ambos compuestos son inhibidores competitivos de NADH y que se enlazan al mismo bolsillo pero de diferente forma. También tiene interés la ausencia de resistencia cruzada con triclosán, porque demuestra que se puede inhibir la enzima de varias maneras sin que se produzcan resistencias cruzadas.

La definición a nivel molecular del enlace entre la piridomicina y la enzima InhA no ha sido posible de forma directa hasta el momento, porque a pesar de un ingente trabajo no se ha encontrado todavía una técnica que permita la obtención

de cristales de InhA, NADH y piridomicina útiles para el estudio del complejo formado por difracción de rayos X. Lo que sí se ha resuelto es la estructura cristalina del complejo InhA (D148G):NADH, la cual se ha comparado con las de los complejos InhA:(NADH) e InhA (S94A):NADH. Superponiendo las tres estructuras, se ha observado que en InhA (D148G):NADH la cadena lateral del residuo Phe149 está rotada alrededor de 90°. Sin embargo, si se superpone la estructura de los complejos InhA (D148G):NADH e InhA:NADH:INH los residuos Phe149 ocupan la misma posición, lo que explica por qué la enzima mutada resistente a piridomicina [InhA(D148G)] es todavía sensible y puede ser inhibida por INH. La rotación de Phe149 origina la apertura de un canal que permite la adición de dos moléculas de agua en el sitio activo y un aumento en la distancia entre NADH y el anillo de Phe149, con la consiguiente disminución de la afinidad por el cofactor, lo que está de acuerdo con los estudios cinéticos. Estos cambios estructurales podrían también explicar la menor sensibilidad a piridomicina de InhA(D148G) comparada con la de la enzima salvaje, puesto que NADH y piridomicina comparten el mismo bolsillo de enlace.

## Conclusión

Desentrañar los hechos que afectan a los complejos procesos biológicos, incluyendo los que se originan como consecuencia de la acción de los fármacos, es con frecuencia lenta y penosa, aunque en los últimos años se están produciendo avances mucho más rápidos gracias fundamentalmente al uso de herramientas genómicas. Sin embargo, la enorme cantidad de información que se va adquiriendo no se refleja todavía con la velocidad que sería deseable en la aparición de nuevas terapias.

Hoy sabemos que las dianas para los fármacos antituberculosos son escasas, y que la más importante parece ser InhA (31), siendo la piridomicina el producto natural más potente para inhibirla.

Una vez más, se pone de manifiesto la importancia de los productos naturales como fuente de nuevos fármacos, posiblemente porque aquéllos son el resultado de una selección a lo largo de la evolución de las especies. Esperemos que este importante estudio permita desarrollar un nuevo fármaco para resolver, al menos por un tiempo, el tratamiento de MDRTB.

## Referencias

1. Schatz, A.; Waksman, S. A.; (1944) "Effect of streptomycin and other antibiotic substances on *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57, 244-248.

2. Chorine, V.; (1945) "Action of nicotinamide on bacilli of the species *Mycobacterium*", C. R. Acad. Sci. 220, 150-151.
3. Fox, H. H.; (1952) "The chemical approach to the control of tuberculosis", Science 116, 129-134.
4. Vilchèze, C.; Jacobs, W. R.; (2007) "The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics", Annu. Rev. Microbiol., 61, 35-50.
5. Winder, F. G.; Collins, P. B.; (1970) "Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*", J. Gen. Microbiol. 63, 41-48.
6. Takayama, K.; Wang, L.; David, H. L.; (1972) "Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*", Antimicrob. Agents Chemother. 2, 29-35.
7. Davidson, L. A.; Takayama, K.; (1979) "Isoniazid inhibition of the synthesis of monounsaturated long-chain fatty acids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra", Antimicrob. Agents Chemother. 16, 104-105.
8. Middlebrook, G.; (1954) "Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli", Am. Rev. Tuberc., 69, 471-472.
9. Saroja, D.; Gopinathan, K. P.; (1973) "Transduction of isoniazid susceptibility-resistance and streptomycin resistance in mycobacteria", Antimicrob. Agents Chemother., 4, 643-645.
10. Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S.; (1992) "The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*"; Nature, 358, 591-593.
11. Jonson, K.; Schultz, P. G.; (1994) "Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*", J. Am. Chem. Soc., 116, 7425-7426.
12. Lei, B.; Wei, C. J.; Tu, S. C.; (2000) "Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of inhA inhibitor", J. Biol. Chem., 275, 2520-2526.
13. Winder, F.; (1960) "Catalase and peroxidase in mycobacteria. Possible relationship to the mode of action of isoniazid", Am. Rev. Respir. Dis., 81, 68-78.
14. Hok, T. T.; (1964) "A comparative study of the susceptibility to ethionamide, thiosemicarbazone, and isoniazid of tubercle bacilli from patients never treated with ethionamide or thiosemicarbazone", Am. Rev. Respir. Dis., 90, 468-469.
15. Larsen, M. H.; Vilcheze, C.; Kremer, L.; Besra, G. S.; Parsons, L.; et al.; (2002) "Overexpression of inhA, but not kasA, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*", Mol. Microbiol., 46, 453-466.
16. Morlock, G. P.; Metchock, B.; Sikes, D.; Crawford, J. T.; Cooksey, R. C.; (2003) "*ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates", Antimicrob. Agents Chemother., 47, 3799-3805.
17. Parikh, S. L.; Xiao, G.; Tonge, P. J.; (2000) "Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid", Biochemistry, 39, 7645-7650.
18. Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C.; (1998) "Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*", Science 279, 98-102.
19. Mdluli, K.; Slayden, R. A.; Zhu, Y.; Ramaswamy, S.; Pan, X.; et al.; (1998) "Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid", Science, 280, 1607-1610.
20. Argyrou, A.; Vetting, M. W.; Aladegbami, B.; Blanchard, J. S.; (2006) "*Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase is a target for isoniazid", Nat. Struct. Mol. Biol., 13, 408-413.
21. Timmins, G. S.; Master, S.; Rusnak, F.; Deretic, V.; (2004) "Nitric oxide generated from isoniazid activation by KatG: source of nitric oxide and activity against *Mycobacterium tuberculosis*"; Antimicrob. Agents Chemother., 48, 3006-3009.
22. Vilcheze, C.; Wang, F.; Arai, M.; Hazbon, M. H.; Colangeli, R.; et al.; (2006) "Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* inhA resolves the target of isoniazid", Nat. Med., 12, 1027-1029.

23. Kruh, N. A.; Rawat, R.; Ruzsicska, B. P.; Tonge, P. J.; (2007) "Probing mechanisms of resistance to the tuberculosis drug isoniazid: Conformational changes caused by inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*", *Protein Science*, 16, 1617-1627.
24. Vilcheze, C.; Weisbrod, T. R.; Chen, B.; Kremer, L.; Hazbon, M. H.; et al.; (2005) "Altered NADH/NAD<sup>+</sup> ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 708-720.
25. Hartkoorn, R. C.; Sala, C.; Neres, J.; Pojer, F.; Magnet, S.; Mukherjee, R.; Uplekar, S.; Boy-Röttger, S.; Altmann, K.-H.; Cole, S. T.; (2012) "Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin-nature's isoniazid", *EMBO Mol. Med.*, 4, 1-11.
26. Glaziou, P.; Floyd, K.; Raviglione, M.; (2009) "Global burden and epidemiology of tuberculosis", *Clin. Chest Med.*, 30, 621-636.
27. Maeda, K.; Kosaka, H.; Okami, Y.; Umezawa, H.; (1953) "A new antibiotic, pyridomycin", *J. Antibiot.*, 7, 140.
28. Shomura, T.; Amano, S.; Yoshida, J.; Kojima, M.; (1986) "*Dactylosporangiurn fulvum* sp. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 166-169.
29. Huang, T.; Wang, Y.; Yin, J.; Du, Y.; Tao, M.; et al.; (2011) "Identification and Characterization of the Pyridomycin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517", *J. Biol. Chem.*, 286, 20648-20657.
30. Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; et al; (1998) "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence", *Nature*, 393, 537-544.
31. Lamichhane, G.; (2011) "Novel targets in *M. tuberculosis*: search for new drugs", *Trends Mol. Med.*, 17, 25-33.

## Enfermedad de Chagas: El desenlace de un conflicto entre el Parásito y el Sistema Inmunitario

José Antonio Escario García-Trevijano, Alicia Gómez Barrio

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Ciudad Universitaria s/n. Universidad Complutense. 28040 Madrid.  
e-mail: [escario@farm.ucm.es](mailto:escario@farm.ucm.es)

### RESUMEN

Transcurridos más de cien años de su descubrimiento, la patogénesis de la enfermedad de Chagas sigue siendo un tema controvertido. Durante décadas se ha dado mayor relevancia a las consecuencias de la respuesta inmunitaria, hasta el punto de estar considerada como una enfermedad autoinmune. El mimetismo molecular entre antígenos del parásito y del hospedador, la diseminación de epítopos y la activación policlonal son algunos de los mecanismos que explicarían el carácter autoinmune de la enfermedad. Sin embargo, en los últimos años, el interés vuelve a centrarse en el parásito. La utilización de técnicas más sensibles no sólo ha puesto en evidencia su presencia en tejidos, sino que se ha demostrado que existe una correlación entre inflamación y antígenos y/o ADN parasitario. En base a ello, sin descartar la importancia de la respuesta inmune, la necesidad de que persista el parásito está inclinando la balanza hacia consideración como enfermedad parasitaria. Este artículo resume y analiza la participación del parásito, del sistema inmune, así como la influencia de otros factores, como cambios microvasculares o alteraciones neurogénicas, en la patogénesis de una enfermedad que apasiona a parasitólogos e inmunólogos.

**Palabras clave:** Chagas; Patología; Patogénesis; *Trypanosoma cruzi*; Autoinmunidad.

### ABSTRACT

*Chagas' Disease: the outcome of a conflict between the Parasite and the Immune System*

Chagas' disease was described more than one hundred years ago, but its pathogenesis remains controversial. For several decades it has been considered as an autoimmune disease. Molecular mimicry responsible for anti-parasite-

responses that “crossreact” with self-molecules in *Trypanosoma cruzi*-infected host, epitopes dissemination and polyclonal activation support the autoimmune etiology of the disease. However, in the last years, parasites have been detected in tissues of hosts with chronic infections by using more sensitive techniques and also a correlation among inflammation and parasite antigens and/or DNA has been demonstrated. So, rather than discarding the autoimmune hypothesis, Chagas’ disease is considered as a parasite-induced disorder. This review resumes and analyzes the role of the persistence of parasites, the autoimmunity, as well as other factors possibly involved as microvascular changes and neurogenic alterations, in such a disease that interest both parasitologists and immunologists.

**Keywords:** Chagas’ disease; Pathology; Pathogenesis; *Trypanosoma cruzi*; Autoimmunity.

## 1. INTRODUCCIÓN

La reciente conmemoración del centenario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas (Chagas, 1909) ha puesto en evidencia el entusiasmo de los parasitólogos en el esclarecimiento de su patogénesis. Se trata de una parasitosis que ha estado desde su descubrimiento envuelta en la incertidumbre. Desde su denominación inicial como “tiroiditis parasitaria” por su errónea relación con el bocio y el cretinismo, a la consideración del agente etiológico (*Trypanosoma cruzi*) como un saprofito, su descripción ha estado rodeada de numerosos errores y ha suscitado las más variadas polémicas.

Con el transcurso de los años, se han producido importantes avances, que han permitido el conocimiento de todas las intrincadas fases del peculiar ciclo biológico del parásito, el desciframiento de su genoma (1), el éxito de las campañas de control basadas en la eliminación del vector o la aplicación de técnicas moleculares al diagnóstico. Sin embargo, el desarrollo de nuevos medicamentos y la patogénesis de la enfermedad continúan siendo asignaturas pendientes, se siguen utilizando los mismos fármacos, nifurtimox y benznidazol, ambos de eficacia dudosa y manifiesta toxicidad, y sigue sin dilucidarse si es el parásito, el sistema inmune, o la actuación conjunta de ambos, la causa de una patología que con frecuencia acompaña al hospedador toda la vida. Al igual que durante el prolongado conflicto armado (“Guerra de los cien años”) entre Francia e Inglaterra, hubo tiempo de batallas y acuerdos, enfrentamientos y treguas, en los más de cien años de contienda entre parásito y hospedador, se han ido sucediendo ataques y contraataques, respuestas del sistema inmune y mecanismos de evasión del parásito, cuyo desenlace ha sido el desarrollo de las intrigantes secuelas de la enfermedad.

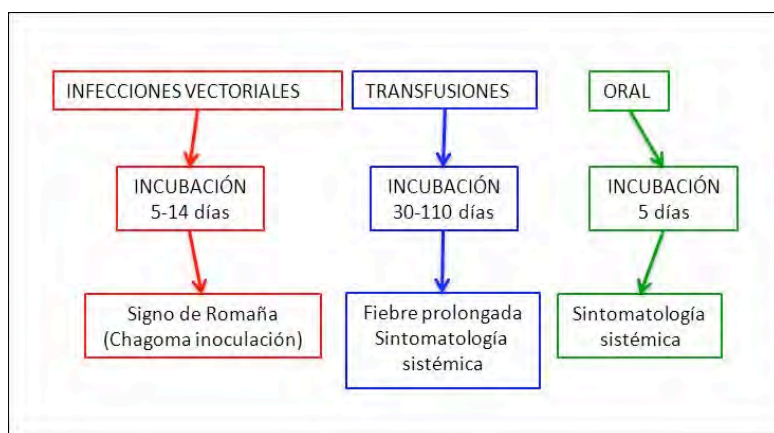
Esta revisión pretende contribuir si no al entendimiento, cuanto menos al conocimiento, de la patogénesis de una enfermedad que apasiona a inmunólogos y



parasitólogos y que sirve de modelo para comprender la relevancia de la asociación patología/respuesta inmune.

## 2. PATOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Clásicamente se ha considerado la sucesión de una fase aguda y una crónica. El desarrollo de las técnicas diagnósticas permitió detectar altas tasas de anticuerpos específicos en pacientes asintomáticos, algunos de los cuales desarrollaban los síntomas típicos de la fase crónica. Esta fase intermedia de la enfermedad se conoce como *fase indeterminada*.



**Figura 1.-** Periodos de incubación según la vía de infección.

La fase aguda presenta sintomatología acusada o grave en sólo el 5% de los casos, con un 0,1% de letalidad en los casos no tratados. Casi el 70% de las manifestaciones clínicas ocurren en población infantil. La desaparición de los síntomas marca el inicio de la fase indeterminada, que en un 70 % de los pacientes permanece de por vida, desarrollando el 30% restante una fase crónica.

El periodo de incubación (Figura 1) varía de 5 a 110 días dependiendo de la vía de infección. En la forma más frecuente de infección, los tripomas tigotes metacíclicos eliminados en las heces del insecto vector (*Triatoma infestans* y otros triatominos) penetran en macrófagos, donde se transforman y multiplican como amastigotes, para como tripomastigotes invadir la corriente sanguínea y linfática, y desde ahí alcanzar células de diferentes tejidos, donde pueden repetir un ciclo similar de multiplicación intracelular. Son frecuentes las infecciones en el tejido muscular, y menos en médula ósea, sistema fagocítico y gónadas, aunque la localización varía según el aislamiento, indicando la existencia de un tropismo tisular. Raramente se encuentran afectadas las células nerviosas y si el parásito llega a esta zona se ubica en astrocitos. La infección aguda va acompañada de una excesiva activación de sistema inmune, incluyendo citoquinemia, intensa activación de linfocitos T y B, linfadenopatía, esplenomegalia y un intenso

proceso inflamatorio difuso o local asociado a los “nidios de amastigotes” tisulares, y a la miocitolisis inducida por el parásito.

La fase indeterminada viene definida por (a) detección de Ig G específicas y/o hallazgo del parásito, (b) ausencia de signos y síntomas de Chagas, (c) ausencia de anomalías del electrocardiograma, y (d) tamaño normal de corazón, esófago y colon por rayos X; si bien es cierto que el avance en las técnicas de diagnóstico ha permitido detectar anomalías y lesiones que antes pasaban desapercibidas. Así, en un estudio sobre 505 casos en fase indeterminada, el 13,8% presentaban lesiones en los segmentos cardiacos en ecografías bidimensionales (2). El *doppler* ecocardiográfico sobre tejidos en pacientes con ecocardiografía normal demostró asimismo alteraciones en la contractilidad (tabique intraventricular), y disfunción izquierda ventricular. Por técnicas de resonancia magnética se han detectado áreas de fibrosis cardiaca en un 20% de los pacientes (3). Y se sabe que la extensión de la fibrosis en pacientes sintomáticos se relaciona con la severidad de las lesiones cardiacas. Los casos de muerte súbita se han relacionado con esta fase de la enfermedad (4).

En dos tercios de los pacientes en fase indeterminada, la enfermedad no progresa, aunque se pueden presentar lesiones inflamatorias de carácter leve en el corazón y tracto digestivo. Del resto, 2/3 desarrollan alguna forma cardiaca y 1/3 terminan con una patología gastrointestinal (5).

La enfermedad crónica se caracteriza por una reacción inflamatoria fibrótica que daña el músculo cardiaco y la red de conducción y el sistema nervioso entérico. La fibrosis cardiaca progresa localizándose generalmente en la región posteroinferior y apical del ventrículo izquierdo, el nódulo sinusal, y el sistema de conducción por debajo del haz de His. De acuerdo con Gascón *et al.* (6), es una cardiopatía dilatada con tendencia a formar aneurismas, sobre todo apicales, con gran potencial arritmo-génico, siendo frecuentes las arritmias ventriculares, muchas veces asociadas a bradiarritmias (de origen sinusal y/o auriculoventricular). Conlleva una elevada frecuencia de fenómenos tromboembólicos, y puede presentarse como dolor precordial, generalmente atípico, aunque eventualmente puede simular una cardiopatía isquémica.

En los casos de desenlace fatal, éste ocurre en los 5 años después de los primeros signos de fallo cardiaco. El peso del corazón puede aumentar hasta los 600 g. Aunque estudios clínicos del año 2000 detectaron una baja incidencia de accidentes cerebro-vasculares en pacientes crónicos (7), en estudios más recientes se afirma que esos accidentes son más comunes en la cardiopatía por Chagas que en otras etiologías (8), y se señala como uno de los primeros signos de diagnóstico de enfermedad de Chagas en pacientes asintomáticos (9).

En la forma digestiva, el megaesófago puede manifestarse ya en niños de 2 años, aunque es más frecuente en pacientes de 20 a 40 años. El megacolon suele desarrollarse con posterioridad al megaesófago. La razón principal son las lesiones inflamatorias en ganglios parasimpáticos, plexos de Auerbach y Meissner de las vísceras huecas, que lleva a ganglionitis y desconexiones neuronales; esto, junto con la inflamación de estas vísceras conduce a constipación. La progresiva retención de heces lleva a la dilatación y engrosamiento de la pared del colon, especialmente sigmoides, y recto. Aunque la prevalencia es bastante inferior, también se han descrito algunos megasíndromes afectando a estómago, duodeno, vesícula biliar y bronquios (10).

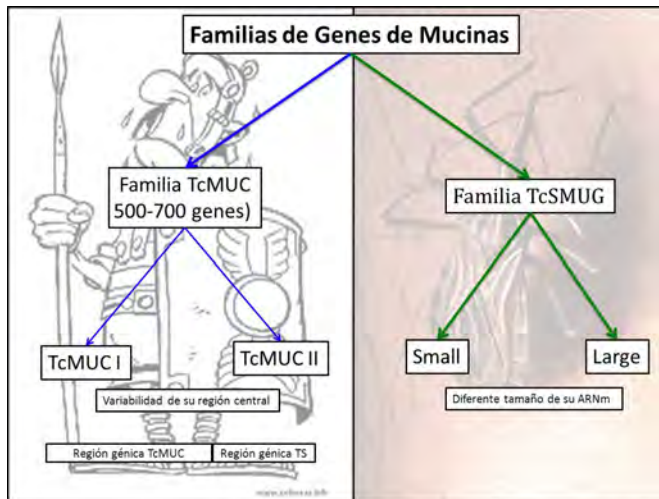
### **3. EL ENFRENTAMIENTO PARÁSITO-HOSPEDADOR**

Después de más de 100 años de descubrimiento de la enfermedad, la patogénesis de fase crónica continúa siendo un enigma, y los científicos siguen con la duda de si es la persistencia de la infección la causa de las alteraciones patológicas (11, 12), se trata de una enfermedad autoinmune (13, 14), o como parece probable son factores de índole diversa, tanto parasitarios como inmunológicos (15), los responsables de la clínica de la enfermedad. Sólo profundizando en el estudio de las interacciones que se producen entre el parásito y el hospedador, se puede inferir el peso específico de cada uno de los factores. En principio, el porvenir de los tripomastigotes en el organismo, dado que la multiplicación es exclusivamente intracelular, depende del éxito de ese primer contacto parásito-célula hospedadora, por lo que los mecanismos de reconocimiento y adhesión celular resultan vitales para garantizar la penetración en la célula, y el establecimiento de la infección. A continuación se aborda el estudio, en primer lugar, de los factores propios del parásito, para a continuación revisar los factores dependientes del hospedador, lo que conduce a considerar la repuesta inmune, y en definitiva sus implicaciones en la patogenia de la enfermedad de Chagas.

#### **3.1. LAS ARMAS DEL PARÁSITO: *Invasión celular***

Durante el contacto hospedador-parásito intervienen moléculas superficiales de ambas células que interaccionan entre sí. Muchas de las moléculas del parásito, que en general se hallan ancladas a la membrana plasmática por gluco-fosfatidil-inositol (GPI), han sido caracterizadas y definida su función. Entre las glicoproteínas de membrana de *T. cruzi*, uno de los grupos más importantes son las mucinas. Son parecidas a las adhesinas involucradas en el tráfico linfocitario, y están constituidas por un núcleo peptídico de 35 a 200 aminoácidos, con abundantes residuos de serina y treonina, que son precisamente los lugares de unión de O-oligosacáridos. Precisamente estos restos glucosídicos, participan junto

a las transialidasas (TS) en la protección del parásito de la acción lítica del complemento.



**Figura 2.-** Genes de mucinas del parásito expresados en el hospedador vertebrado y en el vector.

Las mucinas se dividen en dos grandes grupos (Figura 2), según sean expresadas en el hospedador vertebrado (TcMUC) o en el vector (TcSMUG). La región central de la familia TcMUC, que es variable, las divide a su vez en dos grandes grupos: TcMUC I y TcMUC II. Esta región genética está ligada a la región que codifica las TS, seguramente para asegurar la expresión coordinada de ambas. El segundo grupo (TcSMUG), con una región central corta, se subdivide a su vez en otros dos, en función del tamaño de su ARNm. Las presentes en el insecto, muy homogéneas, tienen entre 35-40kDa y todas con una composición idéntica en cuanto a aminoácidos y carbohidratos. La diferencia entre los epimastigotes y las formas metacíclicas reside en el ancla para GPI que cambia de un alquilglicerol a ceramida. Las mucinas de los estadios presentes en el mamífero son más heterogéneas y de peso molecular mayor, entre 60 y 200kDa, presentando algunos aislamientos, una porción terminal de galactosa (16). Precisamente estos epitopos son los principales blancos de los anticuerpos anti-Gal, que al bloquear la incorporación de ácido siálico, les hace sensibles a la acción del complemento.

Las TcSMUG tienen una función protectora frente a las proteasas presentes en el intestino del vector. Las mucinas de las formas metacíclicas tienen además un papel crucial en la adhesión y penetración en las células de mamíferos, habiéndose comprobado que su bloqueo con anticuerpos inhibe la invasión celular.

Las mucinas proporcionan lugares de unión para diversos receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) (17) y también se ha descrito su unión a moléculas presentadoras tipo CD1d, capaces de reconocer antígenos glucolipídicos (18). Su heterogenicidad ha llevado al planteamiento de una serie de cuestiones, acerca de su papel en la interacción parásito/ hospedador (16). Algunos autores afirman que no tienen más función que modular o evadir la respuesta inmunitaria

del hospedador, mientras que otros defienden que su acción es antagonizar el desarrollo de células T efectoras por un mecanismo de ligandos peptídicos alterados, como sucede en ciertos virus y en los estados exoeritrocíticos de *Plasmodium* (19). Apoyando la tesis de la evasión parasitaria, el mosaico antigénico puede interferir la respuesta de células B induciendo anergia en linfocitos CD4 específicos y una respuesta de anticuerpos mono-específicos, débiles y de baja afinidad. También esa heterogeneidad podría facilitar la adhesión a múltiples líneas celulares, como sucede con *Toxoplasma*, un parásito promiscuo que presenta en su superficie un mosaico antigénico muy heterogéneo (20).

Además de las mucinas, se han caracterizado e identificado otras glicoproteínas (21) relacionadas con los procesos de reconocimiento y adhesión (gp35/50 y gp83) o penetración (gp82, gp90 y Tc-85), así como proteínas implicadas también en estos procesos (penetrina, cruzipaina, oligopeptidasa B y Tc-80) o en mecanismos de la inmunidad innata relacionados con la supervivencia del parásito en los estadios iniciales de la infección (transialidasas, Tc-52 y cruzipaina) (22-24).

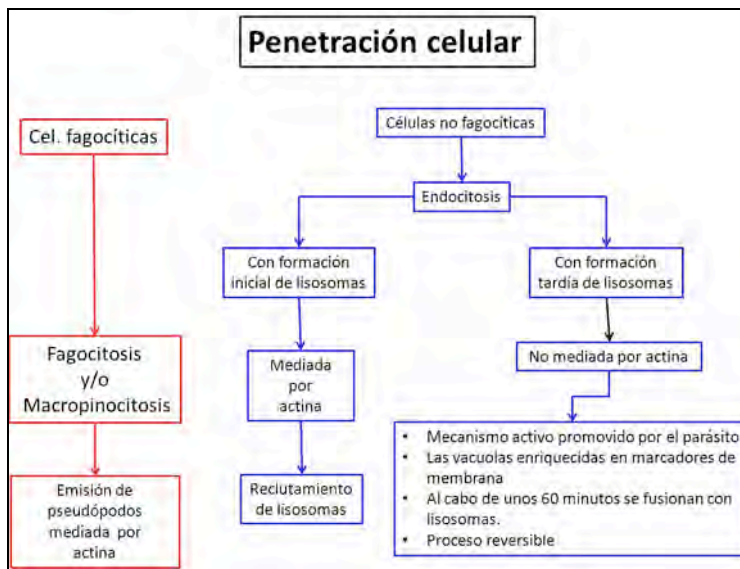
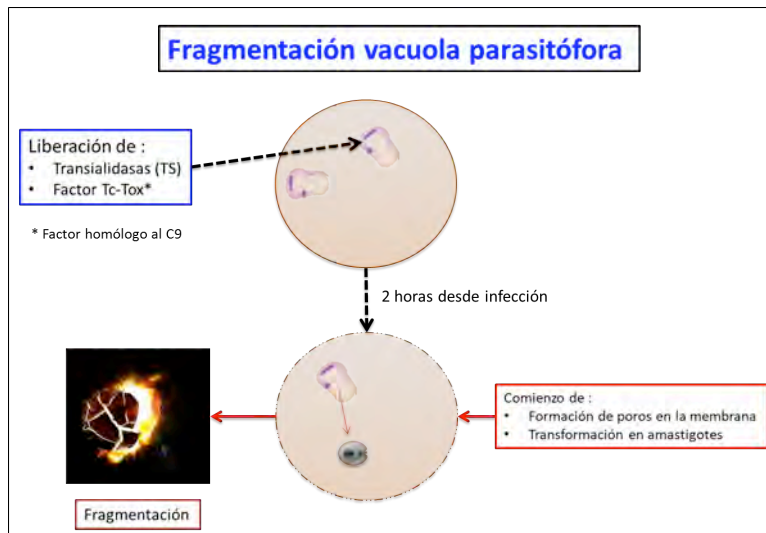


Figura 3.- Mecanismos de penetración celular de *T. Cruzi*.

Entre los mecanismos utilizados por los tripomastigotes (Figura 3), el más común para invadir los macrófagos es la fagocitosis. Para la invasión de las células no fagocíticas, el proceso de penetración tiene lugar por endocitosis (25), con o sin formación inicial de lisosomas. En el primer caso, el proceso está mediado por actina, y tiene lugar un reclutamiento de lisosomas al lugar de entrada, iniciado por la movilización de  $Ca^{2+}$ , que regula la exocitosis de los lisosomas hacia la membrana plasmática. En el segundo, el proceso es un mecanismo activo promovido por el parásito, que provoca una invaginación de la membrana (26) y la formación de una vacuola, que se fusiona con los lisosomas (60 min.) para formar un fagolisosoma.

Si esta fusión no tiene lugar, el proceso es reversible y el tripomastigote podría volver al medio extracelular.



**Figura 4.-** Fragmentación de la vacuola e invasión citoplasmática

Independientemente de cual sea el mecanismo de entrada, se forma la vacuola parasitófora, cuya composición parece ser modulada por el parásito. En este escenario, el protagonismo corre a cargo de los lisosomas, principalmente por tres razones: (a) son cruciales para la formación de la membrana de la vacuola, (b) su entorno ácido proporciona el pH necesario para la fragmentación de la membrana, y (c) proporcionan puntos de anclaje para retener al parásito y reducir su alta movilidad, que de otro modo podría romper la célula y hacer fracasar la infección. Entre los componentes detectados en la vacuola, destacan los receptores Fc, integrinas  $\beta 1$ , glicoproteínas de membranas lisosomales, receptores CR3, gliconjugados y residuos de galactosa.

A continuación (Figura 4) tiene lugar el “escape” del parásito de la vacuola, mediante un proceso de lisis de la membrana. Para ello, el parásito libera TS que eliminan residuos de ácido siálico de la membrana de la vacuola, y la hace sensible a un factor secretado por el parásito denominado Tc-TOX, un péptido homólogo al componente C9 del complemento (21, 27). Las formas tripomastigote comienzan a diferenciarse cuando aún se encuentran en el interior de la vacuola parasitófora, dando comienzo el proceso de fragmentación, aproximadamente 2 horas después de la infección.

Las formas amastigote comienzan a multiplicarse en el citoplasma celular después de un periodo comprendido entre 20 y 35 horas; después de aproximadamente nueve generaciones (26), el proceso termina con la transformación en formas tripomastigote en el citoplasma celular. La elevada

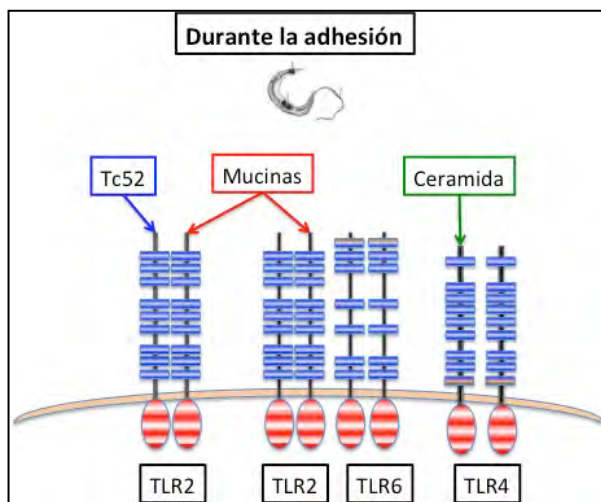


movilidad de éstos induce la rotura de la membrana celular, liberando a los parásitos al medio extracelular .

Aunque existen menos estudios sobre las moléculas de superficie de los amastigotes, éstas también son capaces de invadir nuevas células, como lo demuestra la existencia de una proteína ubicua (p21), que parece involucrada en el proceso de invasión (28). Asimismo, los amastigotes presentan el factor Tc-TOX y TS, lo que sugiere que también serán capaces de invadir tanto células fagocíticas como no fagocíticas. La principal diferencia en el proceso de penetración es que los amastigotes dependen de la actina para poder efectuar la invasión, al carecer del mecanismo activo exclusivo de los tripomastigotes.

### 3.2 LAS ARMAS DEL HOSPEDADOR: Respuesta inmune

Siguiendo el curso normal de la respuesta inmunitaria, el primer contacto ocurre con los macrófagos y células dendríticas próximos al lugar de penetración.



**Figura 5 .-** Reconocimiento de PAMPs por distintos TLRs en el proceso de adhesión.

El reconocimiento del parásito (Figura 5) se efectúa a través de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), especialmente del grupo de receptores tipo *Toll* (TLRs). La presencia de ácidos grasos saturados en las zonas GPI de anclaje de las mucinas (29) promueve el reconocimiento de *T. cruzi* por los macrófagos. Entre los TLRs involucrados en el reconocimiento de mucinas de superficie del parásito, se encuentran el TLR2 y el conjunto TLR2-TLR6 (30). Además, la proteína Tc52 secretada por el parásito, es reconocida a través de TLR2, induciendo la secreción de citoquinas y moléculas coestimuladoras vía NF-

kB (31). Los GPI de los tripomastigotes metacíclicos, que contienen ceramida, van a ser reconocidos por TLR4 (32).

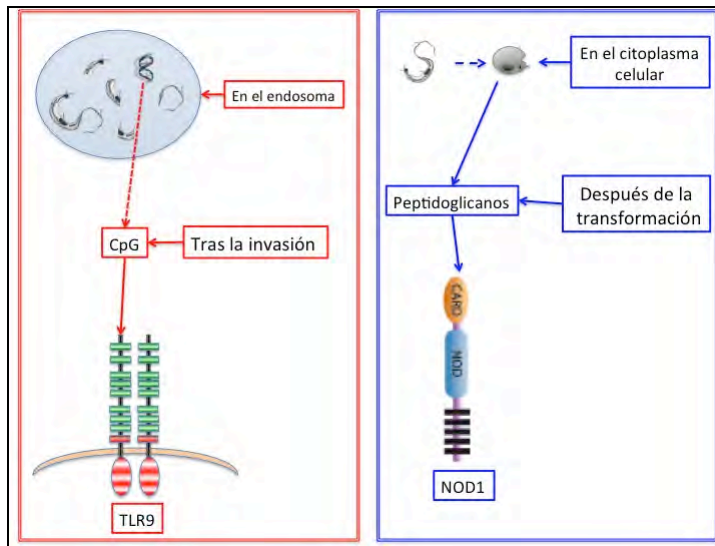


Figura 6.- Reconocimiento de PAMPs por receptores endocelulares.

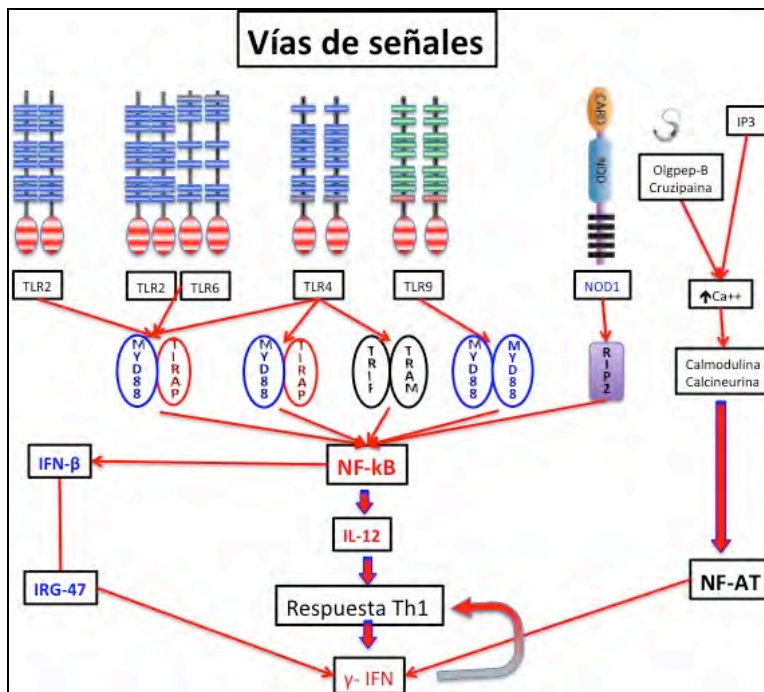


Figura 7.- Inducción de IFN-γ por las diferentes vías activadas por el parásito.

También el ADN parasitario es un blanco de reconocimiento por el sistema inmunitario, especialmente los motivos CpG (cuyo contenido en *T. cruzi* representa un 51%). Estas regiones CpG van a ser reconocidas por los TLR9 (Figura 6) en los lisosomas, haciéndose accesibles una vez que el parásito ha sido destruido (33). Además de los TLRs, el sistema inmunitario dispone de otras vías de



reconocimiento, como son los receptores citoplasmáticos denominados NOD, que reconocen peptidoglicanos y muramil dipéptidos.

Los TLRs actúan utilizando el adaptador MyD88 (Figura 7), que activa el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que llevará a la producción de IL-12, y a la polarización Th1, que inducirá IFN- $\gamma$ . En el caso de TLR4, aunque también activa a NF- $\kappa$ B, puede utilizar una ruta alternativa a través del adaptador TRIF, con la producción de interferones de tipo I (IFN- $\beta$ ), que a su vez estimulan a su receptor (IFNAR), para la expresión de los genes *IRG47*, que son inductores de IFN- $\gamma$ . El receptor NOD utiliza otro adaptador, pero también activa el factor NF- $\kappa$ B con producción de IL-12 e IFN- $\gamma$ .

Además, el parásito recurre a diversos mecanismos, como la activación de la vía IP3 (inositol tri-P) o la intervención de Tc52, para aumentar los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, a fin de movilizar actina para la formación de lisosomas y facilitar la invasión (34). Pero esa elevación de Ca<sup>2+</sup> activará la vía calmodulina/calcineurina que finalizará con la activación de otro factor de transcripción nuclear, el NF-AT, que inducirá directamente la producción de IFN- $\gamma$ ; constituyendo así otra vía -independiente de PRRs- capaz de polarizar la respuesta hacia un perfil Th1.

En definitiva, el hospedador dispone de una serie alternativa de caminos redundantes, TLRs, NOD o movilización de Ca<sup>2+</sup>, que llevan a la producción de IL-12 y/o IFN- $\gamma$ , para propiciar la respuesta adecuada, que es la Th1.

La susceptibilidad a la infección se ha estudiado en ratones *knockout* (Tabla 1) con las vías parcial o totalmente inhibidas. Como era lógico esperar, los ratones más susceptibles son los que tienen inhibido el gen del IFN- $\gamma$ (14). De otra parte, se ha comprobado una alta susceptibilidad en ratones que presentaban inhibida la proteína encargada de la translocación de TLR7 y TLR9 a los endolisosomas (UNC93B1), lo que eleva la importancia de estos TLRs y hace a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que reconocen (DNA y RNA), los factores más importantes en la activación de la respuesta innata (35).

Cuando los tripomastigotes son fagocitados por las células dendríticas y procesados, el péptido generado es un péptido exógeno, que como tal sigue la ruta normal de presentación a los linfocitos CD4, vía CMH II. Sin embargo, cuando los tripomastigotes rompen la vacuola parasitófora y se instalan en el citoplasma transformándose en amastigotes, las proteínas procedentes del parásito, secretadas, excretadas o producto de su lisis, son interpretadas por la célula como proteínas endógenas y presentadas vía CMH I a los linfocitos CD8.

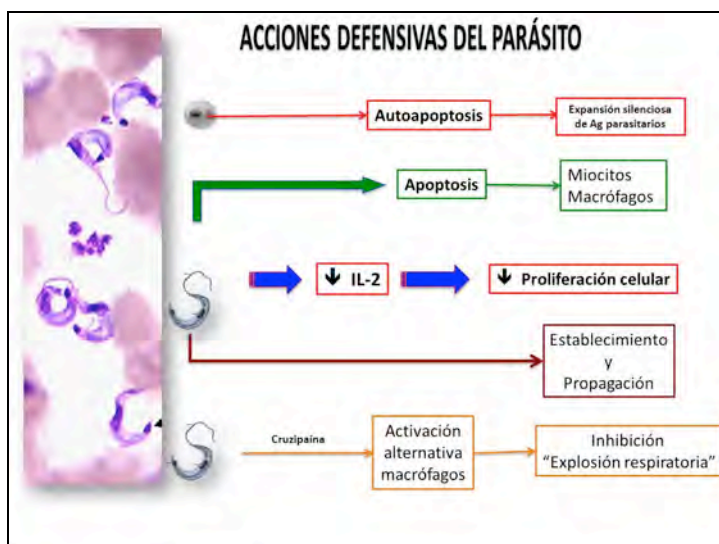
**Tabla 1.-** Susceptibilidad a la infección en ratones *knockout*.

Pérdida de:	Susceptibilidad infección
$\gamma$ - IFN	++++++
MyD88/TRIF	+++++
MyD88	++++
NOD1	++++
TLR2/ TLR9/TLR7	++++
TLR7/TLR9	+++
IRG-47	+++
TLR2	++
TLR4	-

De hecho, esta última vía de presentación, parece más importante, pues se ha comprobado que si se inhibe la formación de la  $\beta$ -microglobulina, los ratones son incapaces de controlar la infección (36).

### 3.3. EL CONFLICTO: Evasión o victoria

Mientras el hospedador prepara una adecuada respuesta adaptativa, el parásito se defiende (Figura 8) bloqueando, al menos en parte, la IL-2 (37) responsable de la expansión clonal de los linfocitos T. La inmunosupresión resultante facilita su establecimiento y propagación. Además, durante el proceso de invasión, algunas cepas inducen en macrófagos y miocitos la apoptosis celular, y se ha comprobado la autoapoptosis de amastigotes, también cepa-dependiente. Este hecho puede contribuir a la propagación silenciosa y a la persistencia del parásito sin provocar una respuesta inflamatoria exagerada (38).

**Figura 8.-** Mecanismos defensivos de parásito frente a la respuesta inmunitaria del hospedador.

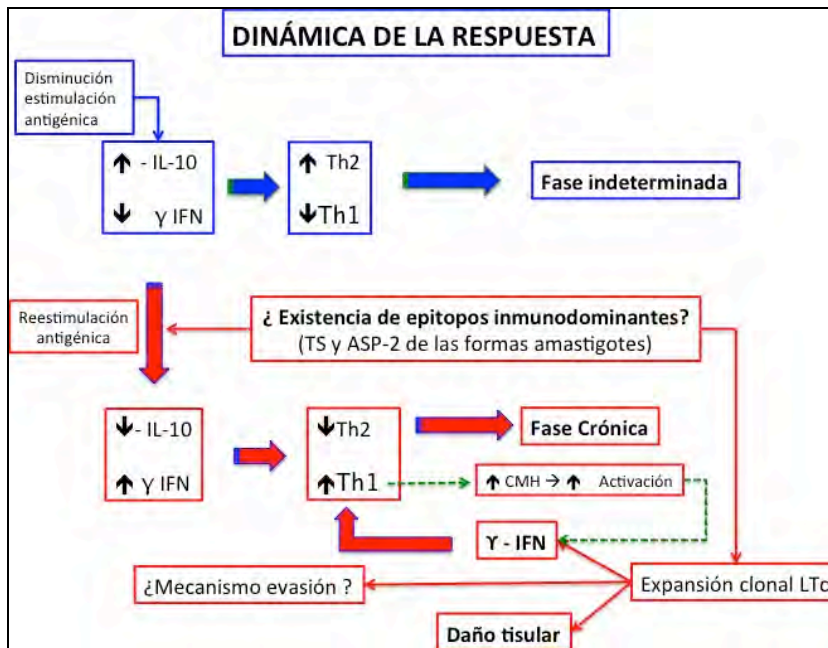
Al igual que sucede con *Leishmania*, *T. cruzi* es capaz de provocar la activación alternativa de los macrófagos por inducción de arginasa, que desvía el metabolismo de la arginina hacia la producción de poliaminas en lugar de NO, favoreciendo el crecimiento intracelular del parásito y su diseminación (23).

Como la mayoría de los protozoos parásitos, *T. cruzi* induce una fuerte y persistente respuesta Th1. En caso contrario, se produce una multiplicación masiva del parásito que suele terminar con la muerte del hospedador. El reconocimiento de los PAMPs del parásito por parte del sistema inmunitario, dispara los mecanismos protectores de la inmunidad innata, que logran controlar parcialmente la infección, comenzando la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF, quimioquinas quimiotácticas, como CCL5, para linfocitos T, células NK, eosinófilos y basófilos, y moléculas de adhesión, que señalizan la localización del foco inflamatorio. Todo ello tiene un triple efecto, por un lado, preparar el terreno para la llegada a la zona de los elementos de la inmunidad adaptativa, especialmente linfocitos T activados, por otro, aumentar el proceso inflamatorio y el poder destructor de los componentes del sistema inmunitario y, finalmente, dar la señal para que las células dendríticas inicien su proceso de migración a los ganglios. Asimismo, los macrófagos y células dendríticas comienzan a secretar IL-12, que inducirá la producción de IFN- $\gamma$  en células NK, y proporcionará la señal polarizante para derivar la respuesta hacia el tipo Th1. El IFN- $\gamma$  producido por LT activados y células NK induce la activación de las células fagocíticas, que efectuarán la “explosión respiratoria” aumentando la eficacia de la respuesta. La producción de IFN- $\gamma$  resulta crucial para el control de la infección durante la fase aguda, comprobándose un agravamiento de los síntomas y una alta mortalidad(14) tras su bloqueo. Finalmente, llegan también a la zona los linfocitos Tc, capaces de reconocer y destruir a las células infectadas, produciendo más IFN- $\gamma$ , que derivará la respuesta aún más hacia el perfil Th1. Recientemente, se ha sugerido que IL-17 juega un papel protector en las infecciones por este parásito (39).

### **3.4. LAS SECUELAS DE LA BATALLA: Patogénesis**

En la mayoría de los casos, todas estas acciones logran controlar, aunque no eliminar la infección parasitaria. La reducción de la población parasitaria frena la respuesta inmunitaria (Figura 9) mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10; esto implica el cese de la respuesta Th1, inhibiendo la acción destructora de los macrófagos (40), inclinando la respuesta del paciente hacia un perfil Th2, que coincide con el inicio de la fase indeterminada (41, 42). Mientras en la leishmaniosis, el parásito es el inductor de la producción de IL-10, en la enfermedad de Chagas no está demostrado. La diferencia puede radicar en la fuente de IFN- $\gamma$  e IL-10 en ambas infecciones; mientras en la primera son los linfocitos CD4

(43), en la tripanosomiasis son las células NK las principales responsables de la producción de IFN- $\gamma$  (44), y los macrófagos y linfocitos T y B, de IL-10 (45).

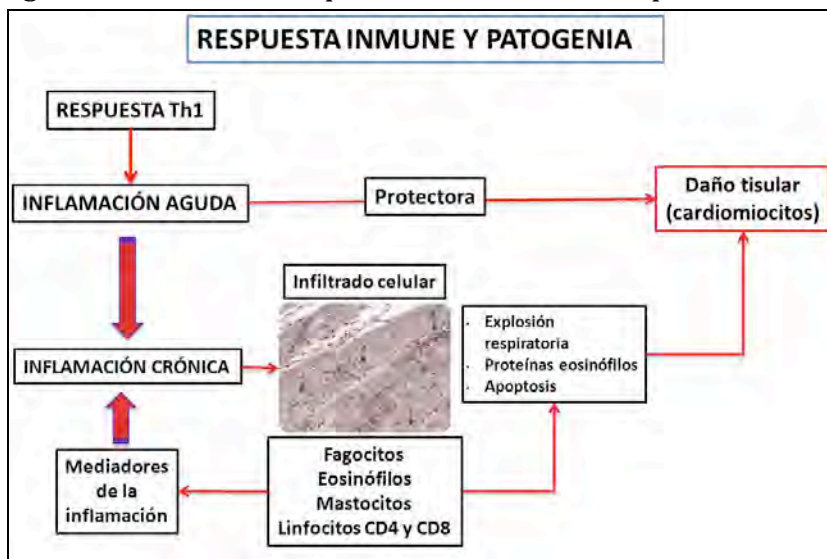


**Figura 9.-** Regulación de la respuesta inmunitaria en el hospedador.

Por razones aún no aclaradas, el inicio de la fase crónica se produce por una disminución de los niveles de IL-10, que determina que el perfil revierta de nuevo al tipo Th1, con presencia de IFN- $\gamma$  y supresión de las citoquinas Th2, IL-4 e IL-10 (41, 46). Una de las razones barajadas es la existencia en el parásito de epítopos inmunodominantes, que son presentados, vía CMH I a los LTc provocando su expansión clonal (1, 47). Esto induciría la producción de IFN- $\gamma$  por estos linfocitos, que polarizaría la respuesta hacia el tipo Th1. Pero como la respuesta se produce frente a unos pocos epítopos, muchos de los linfocitos Tc activados en la expansión clonal, no encontrarían al antígeno específico, reaccionando con las células propias del hospedador, y proporcionando a la vez al parásito un mecanismo de evasión (48). A su vez, la respuesta Th1, proporciona una mayor capacidad de presentación y por tanto de activación, con lo que es probable que aumenten los clones de linfocitos activados, que producirían más IFN- $\gamma$ , introduciéndose así respuesta en un bucle de retroalimentación (Figura 9) para la potenciación de la respuesta Th1.

De este modo, la respuesta inmunitaria (Figura 10), si bien es claramente protectora durante la fase aguda, no lo es tanto durante la fase crónica, ya que esa reacción inflamatoria persistente es la causante del daño tisular que afecta a los cardiomiocitos. Así, se ha comprobado que las células T son una de las principales causas de la cardiopatía chagásica, en principio, como daño colateral en la eliminación del parásito en la fase aguda, y posteriormente como consecuencia del

mantenimiento de la respuesta Th1, seguramente por la estimulación continua del sistema inmunitario por parte del parásito (49). Curiosamente, los pacientes con las cardiopatías más severas muestran altos niveles de TNF (50, 51), citoquina más propia de la inmunidad innata y protagonista de los procesos inflamatorios agudos. Asimismo se produce durante este periodo un infiltrado en el tejido



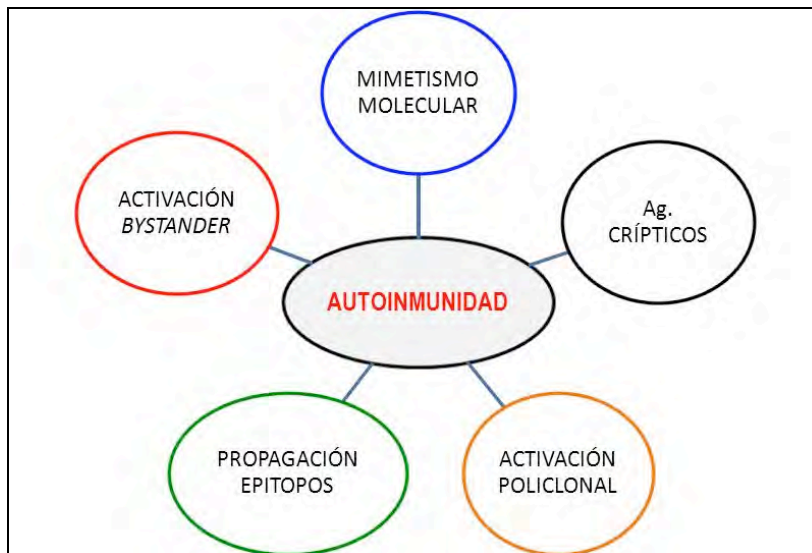
**Figura 10.** - Influencia de la respuesta inmune en el desarrollo de lesiones tisulares.

cardiaco de macrófagos, linfocitos CD8 y CD4, así como un aumento local de moléculas de adhesión (50). En definitiva, la respuesta Th1 es esencial en la resistencia del hospedador a la infección, pero también en la génesis de la miocarditis.

#### 4. LAS EVIDENCIAS DE UNA POLÉMICA: ¿SISTEMA INMUNE O PARÁSITO?

La inducción de lesiones por inmunización adoptiva (13) y la demostración de que la genética del hospedador influye en la patogénesis de la enfermedad son algunas de las bases que sustentan la tesis autoinmune (52). Los mecanismos que intentan explicar el carácter autoinmune (53) de la enfermedad se resumen en la Figura 11, muchos de ellos relacionados. En este sentido, se han identificado algunos autoantígenos que dan reacciones cruzadas con antígenos del parásito, como ocurre con la miosina, principal proteína del músculo cardiaco, y la proteína B13 de *T. cruzi*; así, el 100% de los pacientes chagásicos con cardiopatía presentan esta reacción cruzada, mientras que sólo aparece en el 14,5% de los asintomáticos (54). Son también ejemplos de mimetismo molecular, las proteínas CHA y SAPA, así como el receptor  $\beta$ 1-adrenérgico y una proteína ribosomal, de hospedador y parásito, respectivamente (50). Otro dato que apoya la teoría autoinmune, es el hecho de que las lesiones cardíacas más graves se observan en la fase crónica, con aparente ausencia de parásitos. Esto reafirma la discordancia entre la presencia del parásito y las lesiones cardíacas, y se refuerza por el hecho de encontrarse ADN

del parásito, pero no parásitos intactos (50). Esto unido a la inducción de lesiones inflamatorias por homogenados de *T.cruzi*, apoyaría la tesis del



**Figura 11.-** Mecanismos implicados en la patología autoinmune.

mimetismo molecular.

Otros mecanismos que sustentan la teoría autoinmune son la existencia de antígenos crípticos y activación policlonal (55), mecanismos de evasión muy comunes entre los patógenos. También, la denominada activación *bystander*, que es la activación de células T específicas frente a un antígeno durante la respuesta inmune frente a un antígeno diferente, y puede ocurrir con o sin propagación de epitopos. En la enfermedad de Chagas, esta vía puede ser iniciada tanto por antígenos propios, procedentes de la destrucción tisular como por antígenos parasitarios, en un ambiente rico en mediadores de la inflamación; posteriormente esas células T reaccionarían frente a antígenos propios convirtiéndose así en células T autorreactivas (53). El daño tisular resultante de esta reacción autoinmune produciría la liberación de nuevos antígenos propios, cuyo procesamiento y presentación induciría nuevas reacciones autoinmunes frente a los nuevos epitopos. Teniendo en cuenta que la propagación de epitopos es el proceso por el que epitopos distintos al inductor de una respuesta se convierten en la diana de esa respuesta, ambos mecanismos estarían directamente relacionados.

En defensa de la relación directa entre enfermedad e infección, y su consideración como enfermedad parasitaria, hay cada vez más evidencias. Así, los neutrófilos y eosinófilos sólo dañan a las células sanas “espectadoras” cuando se incuban en presencia del parásito, indicando que es la interacción con el parásito lo que dispara la citotoxicidad (56). Además, la mayor sensibilidad de las técnicas actuales basadas en PCR ha permitido detectar antígenos y ADN de *T. cruzi*



escondido en diversos tejidos infectados; se estima que, aunque en escaso número, los parásitos podrían recircular por el sistema sanguíneo y mantener la respuesta inflamatoria, provocando el daño tisular (57).

El desarrollo de determinadas patologías asociadas a áreas geográficas distintas, junto con el diferente tropismo tisular mostrado por distintas cepas dan asimismo un papel preponderante al parásito (58, 59). Se ha visto que al genotipo TcI se asocian con mayor frecuencia alteraciones cardíacas que al genotipo TcII (60). También hay estudios que correlacionan la patología con diferentes clones (61). De otra parte, el tratamiento con benznidazol en modelos murinos y humanos, provoca un cambio en el fenotipo de las células CD8 propias de la infección persistente, hacia un fenotipo de células T de memoria, con capacidad protectora frente a *T. cruzi*. Este cambio de fenotipo indica una curación total después del tratamiento con benznidazol, que no había tenido lugar en la fase crónica (62). Finalmente, los niveles de autoanticuerpos no se correlacionan con el grado de disfunción cardíaca en enfermos de Chagas (63).

Teorías recientes conjugan, en cierto modo, persistencia del parásito y autoinmunidad, al demostrar la transferencia genética que ocurre desde el parásito al genoma del hospedador. La autoinmunidad sería consecuencia de los cambios fenotípicos inducidos por el ADN parasitario, concretamente por los minicírculos del ADN del kinetoplasto (ADNk), retenido en el genoma del paciente chagásico. Así, la cardiomiopatía inflamatoria que acompaña a la enfermedad de Chagas ha sido denominada como enfermedad autoinmune genéticamente dirigida (64).

Independientemente del origen, autoinmune o parasitario, de las alteraciones orgánicas, se han postulado varias hipótesis que intentan explicar el desarrollo de la enfermedad. Así, la denominada **hipótesis neurogénica** defiende que es la destrucción neuronal tanto en el tejido cardíaco, como en los plexos mesentéricos, la responsable de la descompensación en la respuesta del simpático, que desencadena un efecto tóxico neurohormonal (65). Asimismo se ha comprobado que no hay alteraciones del control parasimpático en los estadios iniciales e intermedios de la enfermedad, y que la pérdida de neuronas es insuficiente para producir manifestaciones clínicas, al contrario de los que ocurre en fase crónica. El problema surge con la comprobación de destrucción neuronal también en zonas cardíacas no afectadas y la amplia variación en número de neuronas inflamadas en diferentes áreas de los ganglios, especialmente los intestinales (66). De otra parte, se sabe que las alteraciones en el simpático y parasimpático van precedidas de daño miocárdico y disfunción ventricular izquierda (67), de modo que las alteraciones nerviosas serían la consecuencia y no la causa del daño cardíaco. También explicaría la pérdida de neuronas vagales y

disfunción parasimpática en pacientes con cardiopatías o cardiomegalias no chagásicas.

La **hipótesis del estrés oxidativo** se basa en el daño producido en los miocitos por intermediarios reactivos del oxígeno (IRO y NO) producidos en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. En este aspecto, se ha visto que los complejos mitocondriales I y II presentan actividades bioquímicas inhibidas en el tejido miocárdico de ratones infectados con *T. cruzi* (68). Esos dos complejos no solo contribuyen a la formación y mantenimiento del gradiente de protones, que permitiría la síntesis de ATP, sino que también producen grandes cantidades de IROs, cuando no funcionan de forma óptima. La actividad superóxido dismutasa es además muy reducida en el tejido miocárdico de los ratones infectados (69, 70). No obstante, situaciones de estrés oxidativo se han documentado también en enfermos no chagásicos (71), por lo que no se puede concluir que la cardiopatía chagásica sea consecuencia del incremento en la producción de IROs. De hecho parece más probable que el daño cardíaco tanto en chagásicos como en no chagásicos promueva una modificación de las actividades mitocondriales, y como en el caso anterior, no se puede asegurar si la disfunción de la mitocondria es un factor causante de la cardiomiopatía o es un simple indicador de la patología.

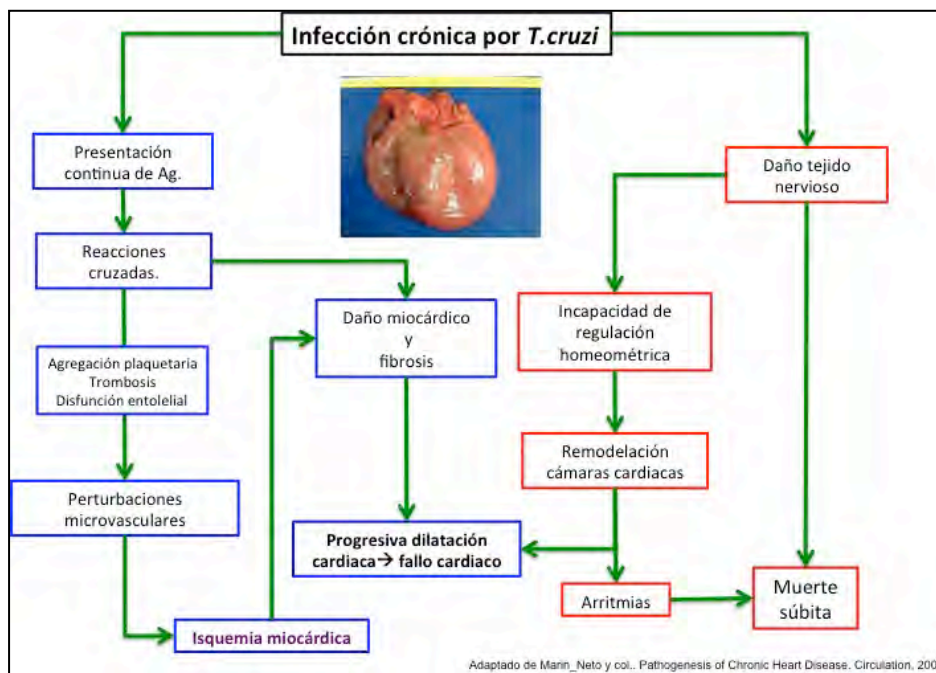
Otros autores, defienden la denominada **hipótesis de la endotelina-1 (ET-1)**, potente vasoconstrictor y estimulante de crecimiento del músculo liso. Los niveles elevados en el plasma de ratones infectados experimentalmente con *T. cruzi*, así como su incremento en ciertas fases de la enfermedad humana, la han implicado en esta patología (72, 73). Esta molécula, producida por fibroblastos y cardiomiocitos se ha ligado a patologías cardiovasculares, en lo que se denomina como remodelación cardíaca (74), siendo el principal factor en el curso clínico que lleva al fallo cardíaco. Así, se ha comprobado que se desarrolla una enfermedad de Chagas más leve en ratones sin gen *ET-1* en sus cardiomiocitos (72). Además, la inhibición de la enzima, que da lugar a la forma activa también se traduce en una disminución de la patología y un menor grado de remodelamiento cardíaco con respecto a los controles. Todas estas observaciones son consistentes con el posible papel de ET-1 como inductor de vasoconstricción y modulador de las alteraciones vasculares observadas en la enfermedad de Chagas.

La **hipótesis de los péptidos natriuréticos**, se basa en su hallazgo en elevadas concentraciones en la circulación, en pacientes con enfermedad de Chagas aguda y crónica con cardiopatía manifiesta (75). En este último grupo, se detecta ANP en los lugares donde hay lesión ventricular, pero no en focos inflamatorios fuera de esas lesiones. Esta particular distribución sugiere que los péptidos natriuréticos son probablemente más un indicador de una alteración cardíaca establecida, que un factor responsable de su génesis, no siendo por tanto su presencia específica de la enfermedad de Chagas (76). Estas conclusiones están



en línea con Bruggnik (77), que encuentra BNP también en células cardiacas de pacientes no chagásicos. Finalmente, la **hipótesis de las perturbaciones microvasculares**, fue planteada a la vista de la correlación encontrada entre la microangiopatía y el daño tisular miocárdico provocado por el parásito (78). Asimismo se ha relacionado la formación de aneurismas, uno de los signos más comunes en la alteración cardíaca provocada por Chagas, con las alteraciones microvasculares o microinfartaciones en las cuencas coronarias debido a la sobreestimulación simpática (79), constituyendo así un puente entre esta teoría y la neurogénica. Todo ello, unido a la hipoperfusión cardíaca observada, llevaría a la isquemia, que sería la principal causa del daño miocárdico. La duda surge en este caso cuando se observa isquemia en sólo un 10% de los pacientes chagásicos (80), por lo que parece poco probable que sea un mecanismo general en la patogénesis de la cardiopatía chagásica. El hallazgo de que tanto las alteraciones capilares como la hipoperfusión no son exclusivos de la cardiopatía chagásica, induciría a pensar que probablemente el daño miocárdico puede preceder a las perturbaciones microvasculares.

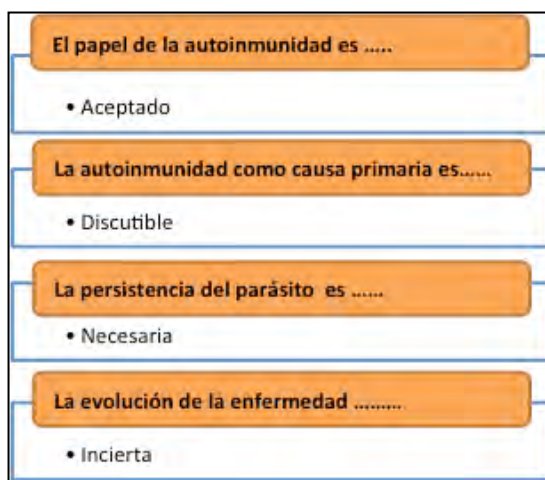
Considerando toda la experiencia acumulada sobre patogénesis de la enfermedad crónica, Marin Neto *et al.* (73) han propuesto un cuadro resumen (Figura 12) que conjuga las diversas teorías expuestas y que intenta explicar los daños miocárdicos y los casos de muerte súbita que se producen en esta patología.



**Figura 12.-** Factores relacionados con las lesiones cardiacas en la infección crónica por *T. Cruzi*.

## 5. EL DESENLACE DEL CONFLICTO

Finalmente, el análisis de toda esta plétora de brillantes hipótesis sobre la patogénesis de la enfermedad de Chagas, nos induce a asumir un origen multifactorial, con cuestiones aún no resueltas (Figura 13). Ahora bien, si como parece es necesaria la presencia del parásito o cuanto menos la inclusión del ADN parasitario en el genoma del hospedador para inducir la autoinmunidad, nos inclinamos por pensar que el parásito está lanzando “señuelos” biológicos para confundir al sistema inmunitario y evadir la respuesta inmune. En definitiva, la enfermedad se mantiene como consecuencia de la interacción de dos genomas altamente variables, y su persistencia se debe a la interacción sostenida entre el parásito y el sistema inmune del hospedador. Y es por tanto el parásito el principal responsable de la patología de la enfermedad.



**Figura 13.** -Sinopsis sobre el estado del conocimiento de la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

## 6. REFERENCIAS

1. El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A.-N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J. F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P. T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasc, A. C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M. J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C. R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J. C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J. L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S. L.; Sanchez, D. O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A. J.; Sisk, E.; Tammi, M. T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D. & Andersson, B. (2005) The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease, *Science* 309, 409-415.
2. Viotti, R. J.; Vigliano, C.; Laucella, S.; Lococo, B.; Petti, M.; Bertocchi, G.; Ruiz Vera, B. & Armenti, H. (2004) Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure, *Heart* 90, 655-660.
3. Rochitte, C. E.; Oliveira, P. F.; Joalbo, M.; Ianni, B. M.; Parga, J. R.; Avila, L. F.; Kalil-Filho, R.; Mady, C.; Meneghetti, J. C.; Lima, J. A. & Ramires, J. A. (2005) Myocardial Delayed Enhancement by

Magnetic Resonance Imaging in Patients With Chagas' Disease:: A Marker of Disease Severity, *Journal American College Cardiology* 46, 1553-1559.

4. Reinaldo, B. B. & Augusto, C. N. (2008) Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era, *International journal of cardiology* 131, 9-17.
5. Pereira JB; da Cunha, R. V.; da Cunha RV; Willcox, H. P. & Coura, J. R. (1990) Development of chronic human chagas cardiopathy in the hinterland of the Paraíba State, Brazil, in a 4.5 year period, *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 23, 141-147.
6. Gascón, J.; Albajar, P.; Cañas, E.; Flores, M.; Gómez Prat, J.; Herrera, R. N.; Lafuente, C. A.; Luciardi, H.; Moncayo, Á.; Molina, L.; Muñoz, J.; Puente, S.; Sanz, G.; Treviño, B. & Salles, X.S. (2007) Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica, *Revista Española de Cardiología* 60, 285-294.
7. Bestetti, R. (2000) Stroke in a hospital-derived cohort of patients with chronic Chagas' disease, *Acta Cardiologica* 55, 33-39.
8. Carod-Artal, F. J.; Vargas, A. P.; Horan, T. A. & Nunes, L. G. N. (2005) Chagasic Cardiomyopathy Is Independently Associated With Ischemic Stroke in Chagas Disease, *Stroke* 36, 965-970.
9. Carod-Artal, F. J. (2010) Trypanosomiasis, cardiomyopathy and the risk of ischemic stroke, *Expert Reviews of Cardiovascular Therapy* 8, 717-728.
10. Köberle, F. (1968) Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis, in *Advances in Parasitology* (Ben, D.; Ed.), pp 63-116, Academic Press.
11. Gutierrez, F. R.; Guedes, P. M.; Gazzinelli, R. T. & Silva, J. S. (2009) The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease, *Parasite Immunology*. 31, 673-685.
12. de Freitas, J. M.; Augusto-Pinto, L.; Pimenta, J. R.; Bastos-Rodrigues, L.; Gonçalves, V. F.; Teixeira, S. M. R.; Chiari, E.; Junqueira, A. C. V.; Fernandes, O.; Macedo, A. M.; Machado, C. R. & Pena, S. D. J. (2006) Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Pathogens* 2, e24.
13. Girones, N.; Carrasco-Marin, E.; Cuervo, H.; Guerrero, N. A.; Sanoja, C.; John, S.; Flores-Herraez, R.; Fernandez-Prieto, L.; Chico-Calero, I.; Salgado, H.; Carrion, J. & Fresno, M. (2007) Role of *Trypanosoma cruzi* Autoreactive T Cells in the Generation of Cardiac Pathology, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1107, 434-444.
14. Junqueira, C.; Caetano, B.; Bartholomeu, D. C.; Melo, M. B.; Ropert, C.; Rodrigues, M. M. & Gazzinelli, R. T. (2010) The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease, *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12, e29.
15. Dutra, W. O. & Gollob, K. J. (2008) Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease, *Current Opinion in Infectious Diseases* 21, 287-292.
16. Buscaglia, C. A.; Campo, V. A.; Frasch, A. C. C.; Frasch, A. F. & Di Noia, J. M. (2006) *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity, *Nature Reviews Microbiology* 4, 229-236.
17. Almeida, I. C. & Gazzinelli, R. T. (2001) Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses, *Journal of Leukocyte Biology* 70, 467-477.
18. Procopio, D. O.; Almeida, I. C.; Torrecilhas, A. C. T.; Cardoso, J. E.; Teyton, L.; Travassos, L. R.; Bendelac, A. & Gazzinelli, R. T. (2002) Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Mucin-Like Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* Bind to CD1d but Do Not Elicit Dominant Innate or Adaptive Immune Responses Via the CD1d/NKT Cell Pathway, *The Journal of Immunology* 169, 3926-3933.
19. Plebanski, M.; Lee, E. A. M.; Hannan, C. M.; Flanagan, K. L.; Gilbert, S. C.; Gravenor, M. B. & Hill, A. V. S. (1999) Altered peptide ligands narrow the repertoire of cellular immune responses by interfering with T-cell priming *Nature Medicine* 5, 565-571.
20. Lekutis, C.; Ferguson, D. J. P.; Grigg, M. E.; Camps, M. & Boothroyd, J. C. (2001) Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme, *International Journal for Parasitology* 31, 1285-1292.

21. de Souza, W.; de Carvalho, T. M. & Barrias, E. S. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction, *International Journal of Cell Biology* 2010.
22. Cazzulo, J. J. (1999) La cruzipaina cistein proteinasa principal de *Trypanosoma cruzi*: secuencia y organización de los genes que la codifican. , *Medicina* 59, 7-11.
23. Stempin, C. C. & Cerban, F. M. (2007) Macrofagos e induccion de arginasa como mecanismo de evasion de parasitos, *Medicina* 67, 737-746.
24. Vermelho, A. B.; Nogueira de Melo, A. C.; Araújo Soares, R.; Sales Alviano, D.; Paraguai Souza, E.; Souto-Padrón, T.; Capaci Rodrigues, G.; Palermo de Aguiar, A.; Pereira, M. C.; Ferreira-Pereira, A.; Maria Socorro S. Rosa, Meirelles, M. N. L. & Alviano, A. C. S. (2010) *Trypanosoma cruzi* Peptidases: An Overview, *The Open Parasitology Journal* 4, 120-131.
25. Tanowitz, H.; Wittner, M.; Kress, Y. & Bloom, B. (1975) Studies of in Vitro Infection by *Trypanosoma cruzi*: I. Ultrastructural Studies on the Invasion of Macrophages and L-cells, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24, 25-33.
26. Andrade, L. O. & Andrews, N. W. (2005) The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention, *Nature Reviews Microbiology*. 3, 819-823.
27. Hall, B. F.; Webster, P.; Ma, A. K.; Joiner, K. A. & Andrews, N. W. (1992) Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm, *The Journal of Experimental Medicine*. 176, 313-325.
28. da Silva, V. C. & Kawashita, C. M. (2009) Characterization of a 21 KDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion, *Microbes and infection* 11, 563-571.
29. Almeida, I. C.; Camargo, M. M.; Procopio, D. O.; Silva, L. S.; Mehlert, A.; Travassos, L. R.; Gazzinelli, R. T. & Ferguson, M. A. J. (2000) Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents, *Embo Journal* 19, 1476-1486.
30. Gazzinelli, R. T. & Denkers, E. Y. (2006) Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism, *Nature Reviews Immunology* 6, 895-907.
31. Ouaisi, A.; Guilvard, E.; Delneste, Y.; Caron, G.; Magistrelli, G.; Herbault, N.; Thieblemont, N. & Jeannin, P. (2002) The *Trypanosoma cruzi* Tc52-Released Protein Induces Human Dendritic Cell Maturation, Signals Via Toll-Like Receptor 2, and Confers Protection Against Lethal Infection, *The Journal of Immunology* 168, 6366-6374.
32. Oliveira, A. C.; Peixoto, J.R.; de Arruda, L. B.; Campos Marco A.; Gazzinelli, R.T.; Golenbock, D.T.; Akira, S.; Previato, J.O.; Mendonca-Previato L.; Nobrega, A & Bellio, M. (2004) Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositol-phospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi, *Journal of Immunology* 173, 5688-5696.
33. Bafica, A.; Santiago, H. C.; Goldszmid, R.; Ropert, C.; Gazzinelli, R. T. & Sher, A. (2006) Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection, *The Journal of Immunology* 177, 3515-3519.
34. Burleigh, B. A. & Woolsey, A. M. (2002) Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion, *Cellular Microbiology* 4, 701-711.
35. Kayama, H. & Takeda, K. (2010) The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection, *Microbes and infection* 12, 511-517.
36. Tarleton, R. L.; Koller, B. H.; Latour, A. & Postan, M. (1992) Susceptibility of [beta]2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection, *Nature* 356, 338-341.
37. Alcaide, P. & Fresno, M. (2004) The *Trypanosoma cruzi* membrane mucin AgC10 inhibits T cell activation and IL-2 transcription through L-selectin, *International Immunology* 16, 1365-1375.
38. De Souza, E. M.; Araújo-Jorge, T. C.; Bailly, C.; Lansiaux, A.; Batista, M. M.; Oliveira, G. M. & Soeiro, M. N. C. (2003) Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models, *Cell and Tissue Research* 314, 223-235.

39. Miyazaki, Y.; Hamano, S.; Wang, S.; Shimano, Y.; Iwakura, Y. & Yoshida, H. (2010) IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection, *The Journal of Immunology* 185, 1150-1157.
40. Reed, S.; Brownell, C.; Russo, D.; Silva, J.; Grabstein, K. & Morrissey, P. (1994) IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection, *The Journal of Immunology* 153, 3135-3140.
41. Costa, G.; da Costa Rocha, M. O.; Moreira, P.; Menezes, C.; Silva, M.; F, G. K. & Dutra, W. O. (2009) Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy, *Journal of Infectious Diseases* 199, 451-455.
42. Gomes, J. A. S.; Bahia-Oliveira, L. M. G.; Rocha, M. O. C.; Martins-Filho, O. A.; Gazzinelli, G. & Correa-Oliveira, R. (2003) Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response, *Infection and Immunity*. 71, 1185-1193.
43. Heinzl, F. P. (1994) Interleukin 12 and the regulation of CD4+ T-cell subset responses during murine Leishmaniasis.; *Parasitology Today* 10, 192-195.
44. Cardillo, F.; Voltarelli, J. C.; Reed, S. G. & Silva, J. S. (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells, *Infection and Immunity*. 64, 128-134.
45. Hunter, C.; Ellis-Neyes, L.; Slifer, T.; Kanaly, S.; Grunig, G.; Fort, M.; Rennick, D. & Araujo, F. (1997) IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*, *The Journal of Immunology* 158, 3311-3316.
46. Ribeiro, B. M.; Crema, E. & Rodrigues Jr, V. (2008) Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease, *Human Immunology* 69, 484-489.
47. Tzelepis, F.; de Alencar, B. C.; Penido, M. L.; Claser, C.; Machado, A. V.; Bruna-Romero, O.; Gazzinelli, R. T. & Rodrigues, M. M. (2008) Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance, *Journal of Immunology* 180, 1737-1748.
48. Rodrigues, M. F.; Alencar, B. C.; Claser, C. & Tzelepis, F. (2009) Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease?, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42, 220-223.
49. Fonseca, S. G.; Moins-Teisserenc, H. L.; Clave, E.; Ianni, B. R.; Nunes, V. L.; Mady, C.; Iwai, L. K.; Sette, A.; Sidney, J.; Marin, M. L. c. C.; Goldberg, A. C.; Guilherme, L.; Charron, D.; Toubert, A.; Kalil, J. & Cunha-Neto, E. (2005) Identification of multiple HLA-A\*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients, *Microbes and Infection* 7, 688-697.
50. Cunha-Neto, E.; Bilate, A. M.; Hyland, K. V.; Fonseca, S. G.; Kalil, J. & Engman, D. M. (2006) Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: A case for molecular mimicry, *Autoimmunity* 39, 41-54.
51. Ferreira, R. C.; Ianni, B. M.; Abel, L. C.; Buck, P.; Mady, C.; Kalil, J. & Cunha-Neto, E. (2003) Increased plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98, 407-412.
52. Leon, J. S.; Godel, L. M.; Wang, K. & Engman, D. M. (2001) Cardiac Myosin Autoimmunity in Acute Chagas' Heart Disease, *Infection and Immunity* 69, 5643-5649.
53. Bonney, K. M. & Engman, D. M. (2008) Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?, *Current Molecular Medicine* 8, 510-518.
54. Cunha-Neto, E.; Coelho, V.; Guilherme, L.; Fiorelli, A.; Stolf, N. & Kalil, J. (1996) Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient.; *Journal of Clinical Investigation* 98, 1709-1713.



55. Minoprio, P. M.; Coutinho, A.; Joskowicz, M.; D'Imperio Lima, M. R. & Eisen, H. (1986) Polyclonal Lymphocyte Responses to Murine *Trypanosoma cruzi* Infection, *Scandinavian Journal of Immunology* 24, 669-679.
56. Molina, H. A. & Kierszenbaum, F. (1989) Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage.; *Immunology* 66, 289-295.
57. Tarleton, R. L.; Zhang, L. & Downs, M. O. (1997) "Autoimmune rejection", of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 3932-3937.
58. Miles, M. F.; Llewellyn, M. S.; Lewis, M. D.; Yeo, M.; Baleela, R.; Fitzpatrick, S.; Gaunt, M. W. & Mauricio, I. L. (2009) The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future, *Parasitology* 136, 1509-1529.
59. Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R.; Campbell, D. A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A. M.; Machado, C. R.; Miles, M. A.; Romanha, A. J.; Sturm, N. R.; Tibayrenc, M. & Schijman, A. G. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104, 1051-1054.
60. Ramirez, J. D.; Guhl, F.; Rendon, L. M.; Rosas, F.; Marin-Neto, J. A. & Morillo, C. A. (2010) Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e899.
61. Andrade, L. O.; Galvao, L. M.; Meirelles Mde, N.; Chiari, E.; Pena, S. D. & Macedo, A. M. (2010) Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 105, 834-839.
62. Bustamante, J. M.; Bixby, L. M. & Tarleton, R. L. (2008) Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease, *Nature Medicine* 14, 542-550.
63. Talvani, A.; Rocha, M. O. C.; Ribeiro, A. L.; Borda, E.; Sterin-Borda, L. & Teixeira, M. M. (2006) Levels of anti-M2 and anti-[beta1] autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease, *Microbes and Infection* 8, 2459-2464.
64. Teixeira, A. R. L.; Hecht, M. M.; Guimaro, M. C.; Sousa, A. O. & Nitz, N. (2011) Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity, *Clinical Microbiology Reviews* 24, 592-630.
65. Dávila-Spinetti, D. F.; Donis H, J. H.; Torres M, A.; Mazzei de Dávila, C.; Arata de Bellabarba, G.; Villarreal, V. & J.A.; F. (2002) La hipótesis neurogénica modificada puede explicar la historia natural de la enfermedad cardíaca chagásica crónica, *Avances Cardiológicos* 22, 55-60.
66. de Souza, M.; Andrade, S. G.; Barbosa Jr, A. A.; Santos, R. T. M.; Alves, V. A. F. & Andrade, Z. A. (1996) *Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system pathology in experimental chagas disease, *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*. 91, 217-224.
67. Davila, D. F.; G.; I.; Mazzei de Davila, C. A. & Marin-Neto, J. A. (1998) Chagas' heart disease and the autonomic nervous system. Commentary, *International Journal of cardiology* 66, 123-131.
68. Vyatkina, G.; Bhatia, V.; Gerstner, A.; Papaconstantinou, J. & Garg, N. (2004) Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1689, 162-173.
69. Wen, J.-J.; Vyatkina, G. & Garg, N. (2004) Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense, *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1821-1833.
70. Wen, J. J.; Dhiman, M.; Whorton, E. B. & Garg, N. J. (2008) Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *Microbes Infection* 10, 1201-1209.
71. Sawyer, D. B.; Siwik, D. A.; Xiao, L.; Pimentel, D. R.; K.; S. & Colucci, W. S. (2002) Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. , *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34, 379-388.

72. Tanowitz, H. B.; Huang, H.; Jelicks, L. A.; Chandra, M.; Loredó, M. L.; Weiss, L. M.; Factor, S. M.; Shtutin, V.; Mukherjee, S.; Kitsis, R. N.; Christ, G. J.; Wittner, M.; Shirani, J.; Kisanuki, Y. Y. & Yanagisawa, M. (2005) Role of Endothelin 1 in the Pathogenesis of Chronic Chagasic Heart Disease, *Infection and Immunity*. 73, 2496-2503.
73. Marin-Neto, J. A.; Cunha-Neto, E.; Maciel, B. C. & Simoes, M. V. (2007) Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease, *Circulation* 115, 1109-1123.
74. Kedzierski, R. M. & Yanagisawa, M. (2001) Endothelin System: The Double-Edged Sword in Health and Disease, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41, 851-876.
75. Benvenuti, L. A.; Aiello, V. D.; Palomino, S. A. P. & Higuchi, M. d. L. (2003) Ventricular expression of atrial natriuretic peptide in chronic chagasic cardiomyopathy is not induced by myocarditis, *International Journal of Cardiology* 88, 57-61.
76. Ribeiro, A. L. P.; dos Reis, A. M.; Barros, M. V. L.; de Sousa, M. R.; Rocha, A. L. L.; Perez, A. A.; Pereira, J. B.; Machado, F. S. & Rocha, M. O. v. C. (2002) Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in Chagas' disease, *The Lancet* 360, 461-462.
77. Bruggink, A. H.; de Jonge, N.; van Oosterhout, M. F. M.; Van Wichen, D. F.; de Koning, E.; Lahpor, J. R.; Kemperman, H.; Gmelig-Meyling, F. H. J. & de Weger, R. A. (2006) Brain Natriuretic Peptide is Produced Both by Cardiomyocytes and Cells Infiltrating the Heart in Patients with Severe Heart Failure Supported by a Left Ventricular Assist Device, *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 25, 174-180.
78. Rossi, M. A. (1990) Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas disease, *American Heart Journal* 120, 233-236.
79. Torres, S. H.; Finol, H. J.; Montes de Oca, M.; Vasquez, F.; J.; P. o. J. & Loyo, J. G. (2004) Capillary damage in skeletal muscle in advanced Chagas's disease patients, *Parasitology Research* 93, 364-368.
80. Marin-Neto, J. A.; Simoes, M. V.; Ayres-Neto, E. M.; Attab-Santos, J. L.; Gallo Jr.; L.; Amorim, D. S. & Maciel, B. C. (1995) Studies of the coronary circulation in Chagas' heart disease, *Sao Paulo Medical Journal* 113, 826-834.

### **NOTA DEL EDITOR**

Este trabajo obtuvo el Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid en el concurso científico 2011 de la Real Academia Nacional de Farmacia.





## Diseño de un genosensor electroquímico para la detección indirecta de gluten en alimentos

Begoña Martín Fernández, Carmen Lorena Manzanares Palenzuela, Marta Sánchez-Paniagua López, Beatriz López-Ruiz, Gloria Frutos Cabanillas

Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid. Spain.

e-mail: [bealopru@farm.ucm.es](mailto:bealopru@farm.ucm.es)

### RESUMEN

Se propone un nuevo genosensor electroquímico para la detección de una secuencia específica de ADN que codifica un fragmento inmunogénico de la  $\alpha$ -2-gliadina, proteína del gluten de trigo responsable de la celiaquía. El diseño del genosensor se basa en la formación de una monocapa autoensamblada de sonda de captura y un agente bloqueante, mercaptohexanol, sobre electrodos de oro serigrafiados. Se eligió un ensayo tipo sándwich, utilizando una sonda indicadora marcada con biotina y el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina como molécula de marcaje. La detección del analito se basó en la medida de la corriente de oxidación del 1-naftol, producto formado por la hidrólisis enzimática del 1-naftil-fosfato, mediante voltamperometría de pulso diferencial. Se investigaron y optimizaron los parámetros implicados en la composición de la fase sensora mediante voltametría cíclica, encontrándose como relación óptima sonda de captura:mercaptohexanol 2 $\mu$ M:9mM. Con el objetivo de minimizar las adsorciones inespecíficas, se optimizaron las concentraciones de sonda indicadora y conjugado enzima-estreptavidina, especies involucradas en la fase de medida, obteniéndose como valores óptimos 1  $\mu$ M y 1,075x10<sup>-3</sup> g/L respectivamente. El genosensor propuesto presentó una respuesta lineal entre 20 y 250 nM.

**Palabras clave:** Genosensor; Voltamperometría; Monocapa autoensamblada; Gluten,  $\alpha$ -2-gliadina.

## ABSTRACT

### *Electrochemical genosensor for indirect wheat gluten detection in food*

A new electrochemical genosensor has been developed for the detection of a specific DNA sequence that encodes for an immunogenic fragment of  $\alpha$ -2-gliadin, protein of gluten wheat that plays an important role in celiac disease. The genosensor is based on a mixed self-assembled monolayer consisting on a capture probe and a diluent molecule, mercaptohexanol, both immobilized on screen-printed gold electrodes. A sandwich-type hybridization assay was selected, using a signaling-DNA probe labeled with biotin and streptavidin-alkaline phosphatase as a reporter molecule. Detection of DNA gluten is based on the measurement of the oxidization current of 1-naphthol, product formed by  $\alpha$ -naphthyl phosphate enzymatic hydrolysis, by differential pulse voltammetry. Parameters involved in the sensing phase were investigated and optimized by cyclic voltammetry. The optimal capture probe to mercaptohexanol ratio was found to be 2  $\mu$ M:9 mM. In order to minimize unspecific adsorptions, both signaling probe and enzyme-streptavidin conjugate concentrations (measurement phase parameters) were optimized (1  $\mu$ M and  $1.075 \cdot 10^{-3}$  g/L respectively). A linear response from 20 nM to 250 nM is obtained with the proposed genosensor.

**Keywords:** Genosensor; Voltammetry; Self-assembled monolayer; Gluten,  $\alpha$ -2-gliadin.

## 1. INTRODUCCIÓN

El gluten es un conjunto de proteínas vegetales de reserva presente en los cereales (centeno, trigo, cebada y avena). La celiaquía es una enteropatía de base inmunológica debida a una intolerancia permanente al gluten, que padecen sujetos genéticamente predispuestos provocando una lesión progresiva de las vellosidades intestinales, cuya consecuencia más importante es la disminución de la absorción de nutrientes. Las proteínas inmunogénicas más estudiadas son las prolaminas, en especial las del trigo, denominadas gliadinas. La respuesta adaptativa más común y más fuerte hacia la gliadina está dirigida contra un fragmento de 33 aminoácidos de longitud de la  $\alpha$ -2-gliadina (1, 2).

Aproximadamente una de cada cien personas padece esta enfermedad, siendo la enfermedad crónica intestinal más frecuente en España (3). El único tratamiento conocido es la dieta libre de gluten durante toda la vida. El etiquetado "sin gluten" que llevan algunos alimentos, indica un contenido máximo de 20 ppm en productos naturalmente libres de gluten y de 100 ppm para productos procesados (4). Aunque estos niveles sean considerados aparentemente no

dañinos, el nivel exacto de inocuidad para los pacientes celíacos es incierto, existiendo casos que se ven afectados con menores concentraciones.

Los métodos de detección de gluten más extendidos son los basados en ensayos ELISA. El principal inconveniente de esta metodología es producir falsos negativos cuando ocurre la desnaturalización de las proteínas por cambios de temperatura o cuando se somete el gluten a tratamientos industriales para aumentar la solubilidad. Además, se pueden producir reacciones cruzadas entre proteínas estrechamente relacionadas, como las proteínas de la soja, muy utilizadas como sustitutivos de las proteínas del gluten en algunos alimentos. No obstante, se han descrito metodologías alternativas, como son: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR) (5-8), Western Blot, espectrometría de masas y cromatografía (3, 9).

En vista de que muchos de los problemas analíticos derivan de la naturaleza proteica de la muestra, el análisis de secuencias específicas de ADN constituye una alternativa interesante dado que el ADN es más resistente a altas temperaturas que las proteínas, y la sensibilidad y especificidad de la detección es mayor.

Actualmente, han surgido nuevas herramientas para la detección de ADN: los genosensores. Éstos son biosensores de ADN, y como tales son dispositivos analíticos que convierten un evento biológico (hibridación) en una señal cuantificable, cuyo elemento de reconocimiento biológico es una secuencia de oligonucleótidos (sonda), complementaria a la secuencia de ADN a determinar (analito), formándose el híbrido de Watson-Crick con elevada eficacia y extrema selectividad en presencia de mezclas de diferentes ácidos nucleicos no complementarios (10, 11). Dentro de los posibles transductores, el electroquímico aporta ventajas como alta sensibilidad, economía, facilidad de uso, portabilidad y compatibilidad con las microtecnologías (12).

En este trabajo se propone el diseño y desarrollo de un genosensor electroquímico para la determinación indirecta de gluten, mediante la detección de una secuencia de ADN específica que codifica un fragmento proteico inmunogénico del gluten.

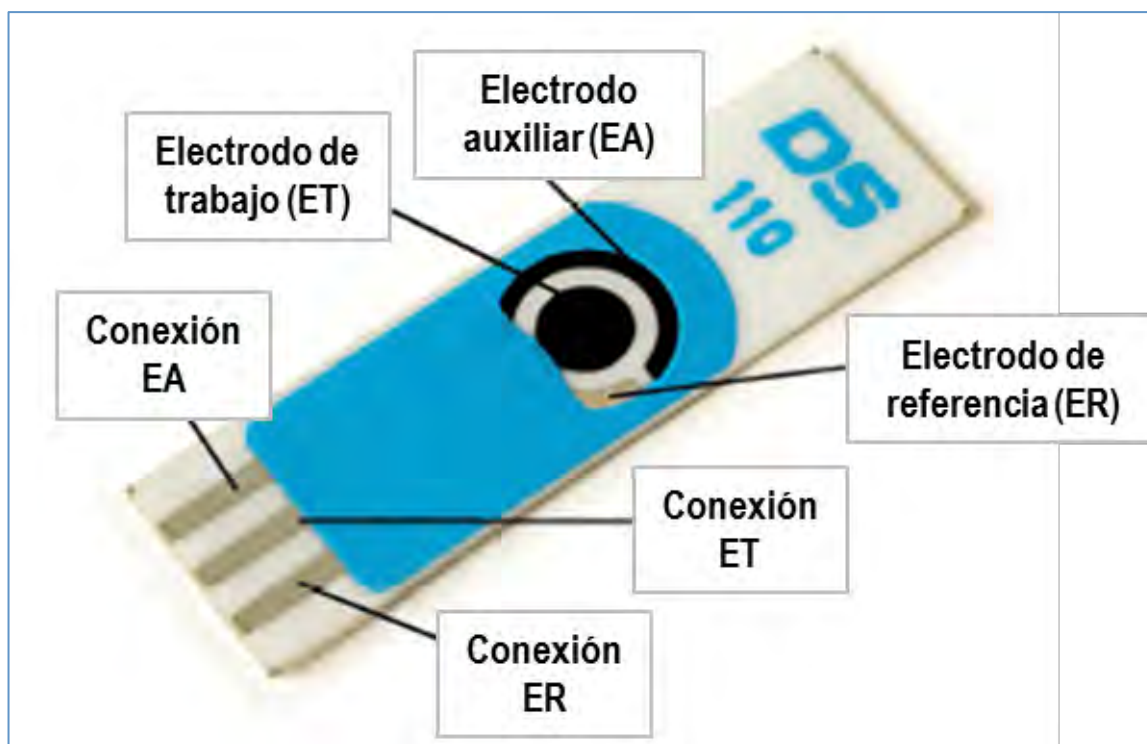
## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Instrumentación**

Las medidas electroquímicas fueron realizadas en electrodos serigrafados (DropSens, España) conectados a un potenciostato PGSTAT 12, controlado por el software GPES 4.9005 (EcoChemie B.V, Holanda). La celda consta de tres electrodos en la misma lámina de alúmina (Figura 1): un electrodo de trabajo de oro serigrafado (diámetro 4 mm), rodeado de un electrodo auxiliar también de oro serigrafado y uno de pseudoreferencia de plata. Previamente a su uso, los

electrodos se limpiaron con etanol y agua Milli-Q, seguido de un pretratamiento electroquímico mediante barridos cíclicos con  $H_2SO_4$  con el fin de eliminar contaminantes y calcular el área efectiva del electrodo (13).

Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y cada medida se realizó en un nuevo electrodo. Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro Crison micropH 2001 (España).



**Figura 1.-** Electrodo serigrafiado ([www.dropsens.com](http://www.dropsens.com)).

## 2.2. Reactivos

El Ditiotreitól (DTT), 6-mercapto-1-hexanol (MCH), fosfatasa alcalina-estreptavidina (ALP-Strp), 1-naftilfosfato, albúmina humana (BSA) y tween 20 fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (España) y utilizados sin purificación previa. Las sales para la preparación de los buffers (Tris,  $MgCl_2$ , KCl) y buffer 20xSSPE (fosfato sódico salino con EDTA) pH 7,4 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Etanol al 96% e hidroquinona fueron suministrado por Panreac (España), 1-naftol por Merck (España) y ferrocianuro de potasio por Probus (España).

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas fueron suministradas por Sigma-Genosys (Reino Unido). Todas las disoluciones de oligonucleótidos fueron preparadas en agua Milli-Q y almacenadas a  $-20^{\circ}C$ .

### 2.3. Procedimiento experimental

#### A.- Sonda de captura

Con el objetivo de reducir los enlaces disulfuro S-S, formados por la unión de dos moléculas ADN-SH (14, 15) se procedió a su tratamiento con DTT. Para ello se disolvió el contenido del vial (63,6 nmol de sonda de captura) en 100  $\mu$ L de una disolución acuosa de DTT 0,1 M y se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. A continuación, la sonda tiolada fue purificada por elución en una columna NAP-10 de Sephadex G-25 (lecho de dextrano) con 1,5 mL de agua Milli-Q. Se determinó la concentración real midiendo su absorbancia a 260 nm, encontrándose un 97 % de recuperación respecto a la cantidad inicial del vial. Esta disolución fue almacenada en el congelador.

#### B.- Preparación del sensor

##### *Preparación de la fase sensora.*

Inmovilización de la sonda de captura mediante quimisorción (unión covalente ADN-SH – Au). Se depositan sobre el electrodo 40  $\mu$ L de una disolución de la sonda de captura en buffer 2xSSPE pH 7,4 (buffer de hibridación y de inmovilización) dejándose en atmósfera cerrada y saturada con agua durante 1 h y lavado.

##### *Bloqueo electródico*

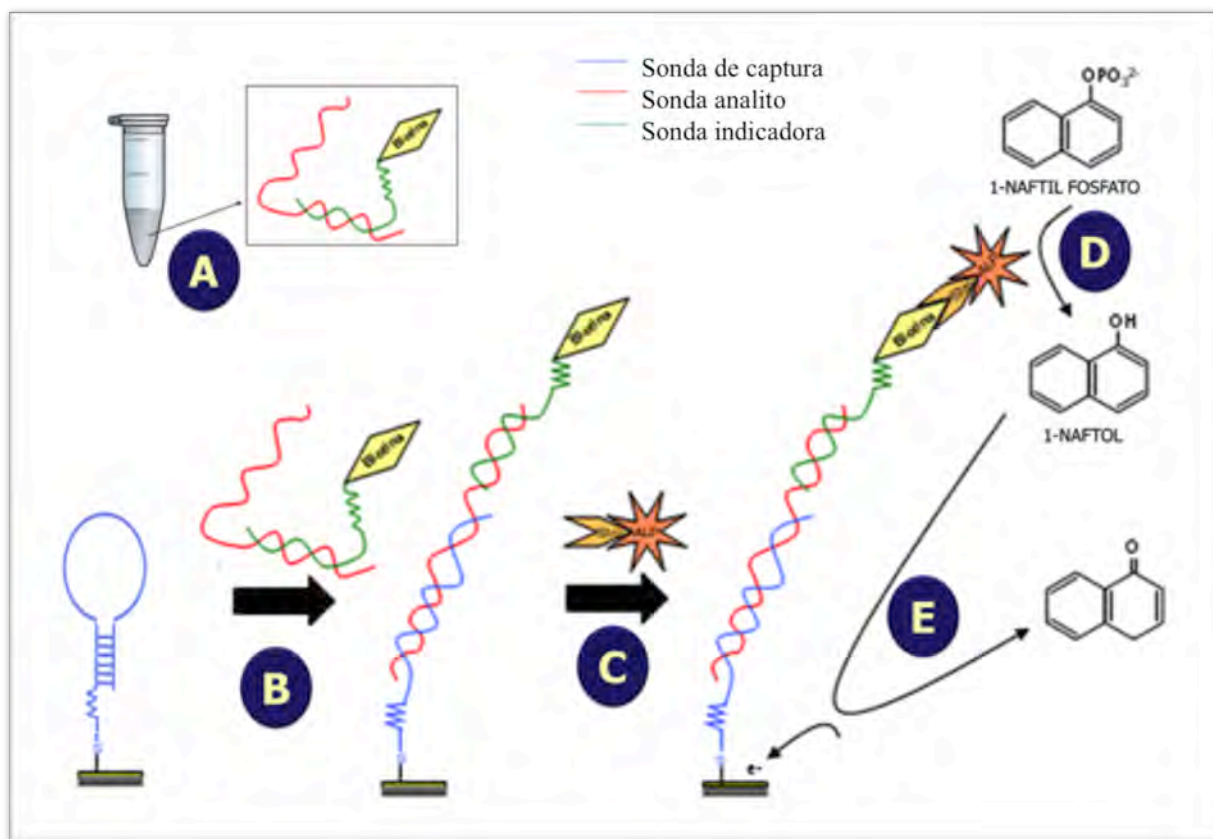
Se adicionan 40  $\mu$ L de una disolución de MCH en buffer 2xSSPE, dejándose 30 min, seguido de lavados.

##### *Etapa de hibridación*

- Homogénea. Se mezcla la disolución del analito con la sonda indicadora en buffer 2xSSPE (Figura 2A), calentando durante 5 min a 100 °C y sumergiendo 5 min en hielo.
- Heterogénea. Se depositan 40  $\mu$ L de la disolución anterior sobre la fase sensora. Se espera 1 hora y se lava (Figura 2B).

##### *Marcaje enzimático y detección electroquímica*

Concluida la hibridación, sobre la fase sensora se añaden 40  $\mu$ L de disolución del conjugado ALP-Strp en buffer bloqueante o de incubación (5xSSPE pH 7,4, 2% BSA y 0,1% Tween 20 (Figura 2C), se deja 10 min y se lava. Se añaden 40  $\mu$ L de 1-naftilfosfato 4 mM en buffer de medida (0,5 M Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M KCl, pH 9,8). Transcurridos 10 min de incubación, se realiza la medida voltamperométrica (DPV) de 0 a +0,6 V (amplitud de pulso 20 mV y velocidad de barrido 10 mV/s) (Figura 2D y E), desechando el electrodo tras la medida.



**Figura 2.** -Esquema del ensayo tipo sándwich.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Diseño propuesto

El diseño del genosensor se basa en la formación de una monocapa autoensamblada compuesta por sonda de captura y un agente bloqueante. Se propone un ensayo tipo sándwich en el cual parte de la secuencia del analito es complementaria con la sonda de captura y parte con una sonda indicadora, esta última marcada con una molécula de biotina en su extremo 3' para su posterior unión al conjugado estreptavidina-enzima a través del enlace de alta afinidad biotina-estreptavidina. Con este ensayo se evita la necesidad de marcar al analito. La enzima utilizada, fosfatasa alcalina (ALP), cataliza la conversión de 1-naftilfosfato a 1-naftol, producto electroactivo de estructura plana heterocíclica capaz de intercalarse en la monocapa de ADN, cuya oxidación se mide mediante voltamperometría de pulso diferencial (DPV).

#### 3.2. Elección de la sonda de captura

Debido a la capacidad antigénica demostrada del segmento de 33-mer de la proteína  $\alpha$ -2-gliadina, se seleccionó la secuencia de 99 nucleótidos que codifica para este fragmento proteico, para ser utilizada como analito.

Con el fin de conocer la especificidad de la secuencia elegida como analito se utilizó el programa BLAST (16) comprobándose que sólo tiene homologías con secuencias específicas de trigo y no con otras especies como hongos y bacterias ambientales, que podrían generar interferencias en el análisis.

Para predecir las posibles estructuras secundarias del fragmento de ADN y su hibridación con la sonda de captura e indicadora, se utilizó una base de datos llamada *Mfold web Server* (17). La estructura secundaria tipo mango-bucle de la sonda de captura presenta una energía libre  $\Delta G = -10,7$  Kcal/mol. La formación del híbrido analito-sonda de captura presenta una  $\Delta G_{\text{dúplex}} = -49,8$  kcal/mol, demostrando la apertura espontánea de la sonda en presencia de analito. El analito y sonda indicadora poseen una estructura secundaria cuya formación presenta valores de  $\Delta G = -12,5$  Kcal/mol y  $\Delta G = -13,2$  Kcal/mol respectivamente, superiores a la energía del híbrido analito-sonda indicadora ( $\Delta G = -113,1$  Kcal/mol), lo que indica la hibridación espontánea de la sonda indicadora con el híbrido analito-sonda de captura.

### 3.3. Caracterización de los electrodos serigrafiados

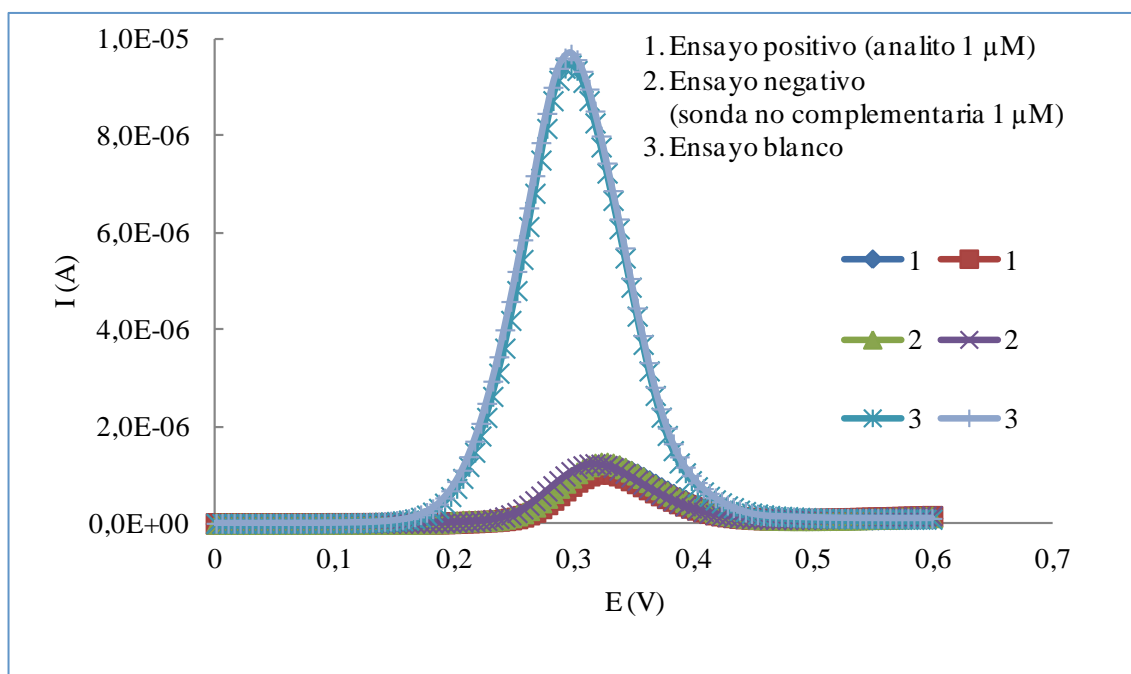
Para comprobar reproducibilidad de la superficie electródica, se realizaron voltamperometrías cíclicas entre +0,6 a -0,1 V (60 mV/s, 10 barridos) con ferrocianuro de potasio 0,5 mM en buffer 2xSSPE (18, 19). Se midió la intensidad del pico de oxidación para 10 electrodos pretratados con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y obteniéndose un coeficiente de variación de 5,7%, confirmando la adecuada reproducibilidad del proceso de serigrafiado.

### 3.4. Ensayos preliminares de respuesta del genosensor

Se estudió la interacción entre la sonda de captura y el híbrido analito-sonda indicadora y se evaluó la especificidad de esta interacción mediante el uso de una secuencia no complementaria. Para determinar el ruido de fondo originado en parte por las uniones inespecíficas a la superficie electródica de los reactivos utilizados, se realizó un ensayo del blanco. Estos ensayos se realizaron con sonda horquilla 2  $\mu\text{M}$ ; MCH 4,5 mM; sonda indicadora 2  $\mu\text{M}$ ; ALP-Strp  $4,3 \cdot 10^{-3}$  g/L y 1-naftil-P 4 mM.

El ensayo con la sonda no complementaria dio una intensidad de 1,1  $\mu\text{A}$  similar a la obtenida en el ensayo del blanco. En estas mismas condiciones experimentales, una concentración de analito 1  $\mu\text{M}$  dio una intensidad de 9,54  $\mu\text{A}$  (Figura 3), aproximadamente 9 veces superior al blanco y al ensayo negativo. Estos resultados muestran la especificidad del método propuesto.





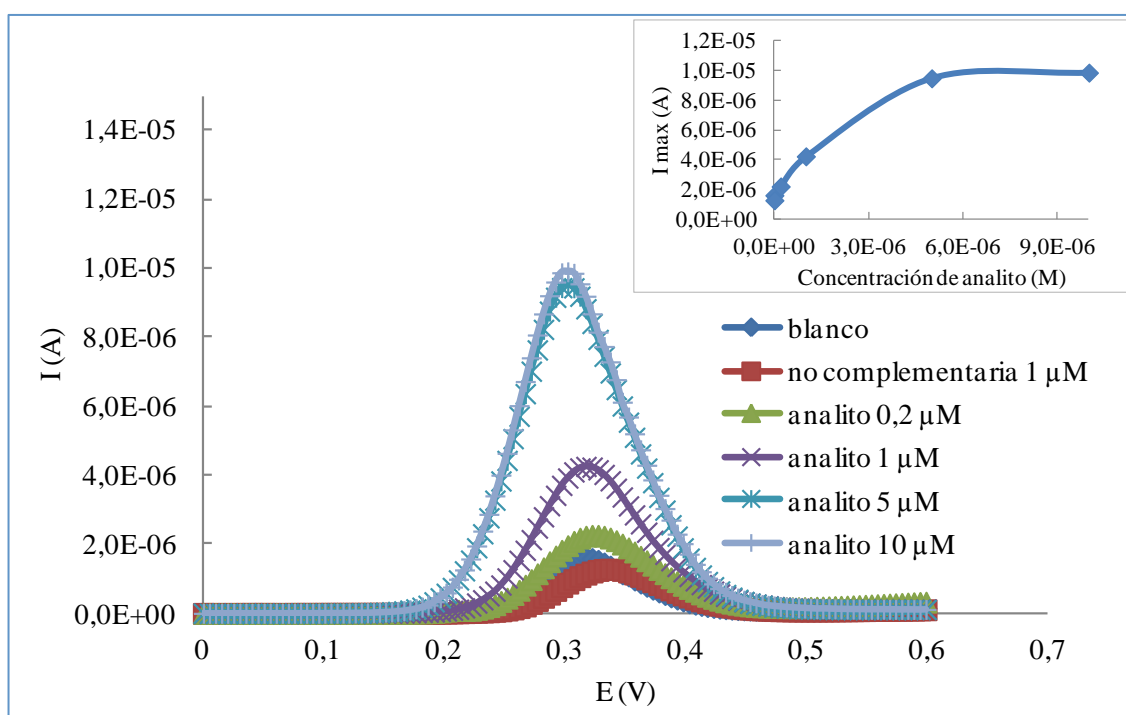
**Figura 3.-** Voltamperogramas obtenidos en los ensayos positivo, negativo y blanco.

Con el fin de averiguar la relación existente entre la señal y la concentración de analito se midieron disoluciones de concentraciones comprendidas entre 0,2 y 10  $\mu\text{M}$  del mismo. Sorprendentemente, se obtuvo la máxima respuesta para la menor concentración de analito. Es posible que estos resultados se atribuyan a la baja concentración de algunos de los reactivos implicados en las reacciones de hibridación o amplificación enzimática, y por ello se estudió de forma individual cada etapa del proceso.

Para conocer la influencia de la sonda indicadora, se repitió la experiencia anterior utilizando una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de dicha sonda, observándose una relación proporcional entre la respuesta y la concentración de analito hasta 5  $\mu\text{M}$  (Figura 4). Estos resultados dejan patente la importancia de este parámetro, ya que amplía el límite lineal superior sin olvidar su efecto negativo en la señal del blanco.

A continuación, se aumentó la concentración de conjugado ALP-Strp. Al utilizar una concentración de enzima de  $8,6 \times 10^{-3}$  g/L, se obtuvieron señales proporcionales a la concentración de analito hasta 10  $\mu\text{M}$  (Figura 5), confirmándose también el efecto de este parámetro en la respuesta. Mayores concentraciones de enzima ( $17,2 \times 10^{-3}$  g/L) dieron curvas voltamperométricas distorsionadas y blancos anormalmente altos, resultados que confirman la adsorción inespecífica de este reactivo sobre la fase sensora.





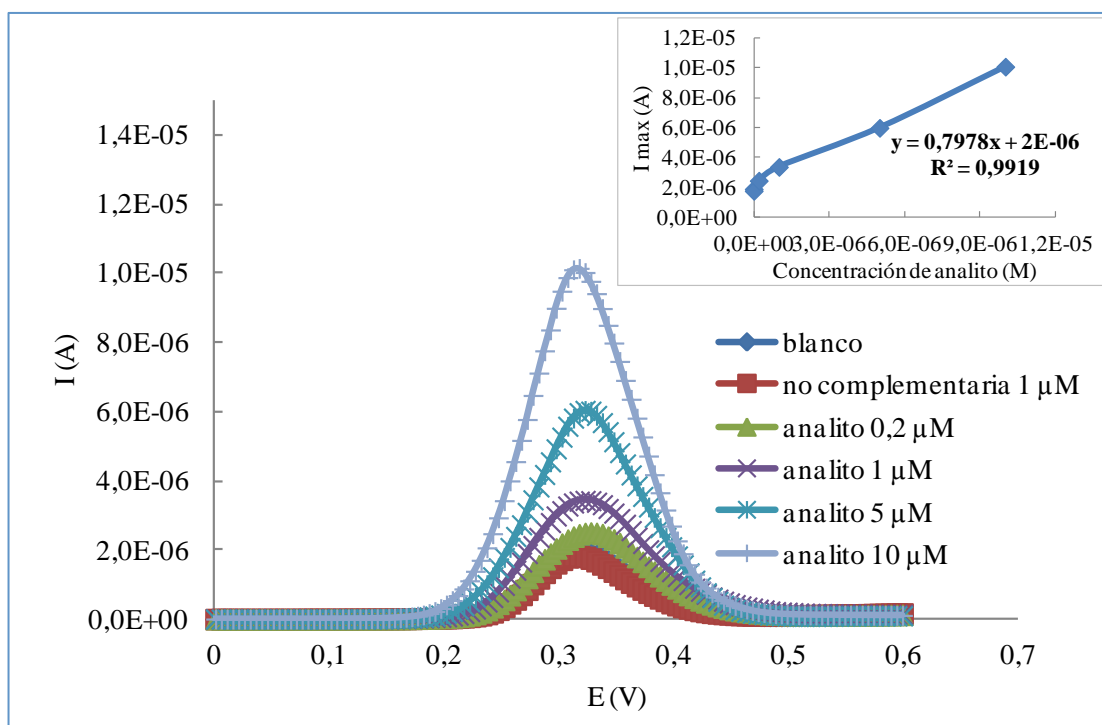
**Figura 4.-** Respuesta del genosensor con sonda indicadora 10  $\mu\text{M}$ . Inlet: Relación  $I_{\text{max}}$ -concentración de analito.

Considerando que un aumento de la concentración de sonda indicadora y enzima conlleva un aumento en el intervalo lineal pero también origina un aumento de la señal del blanco, y dado que nuestro objetivo es la detección de concentraciones de analito inferiores a 1  $\mu\text{M}$ , comenzaremos utilizando de las mínimas concentraciones estudiadas ( $4,3 \cdot 10^{-3}$  g/L de ALP-Strp y 2  $\mu\text{M}$  de sonda indicadora).

### 3.5. Optimización de la fase sensora

La optimización de la fase sensora (sonda de captura y MCH inmovilizados sobre la superficie del electrodo de trabajo) es necesaria para obtener una monocapa homogénea que favorezca la hibridación pero no tan compacta que genere repulsiones electroestáticas y electroestéricas (20).

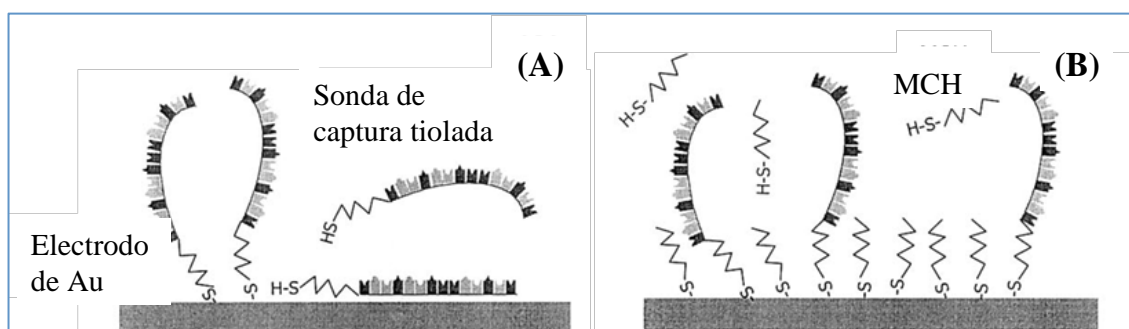
La función del MCH es disponer adecuadamente las hebras de ADN quimisorbidas, algunas inicialmente inclinadas, situándolas de manera perpendicular a la superficie (11). El MCH se intercala entre las hebras de ADN y se obtiene así una monocapa mixta organizada, en la que las cadenas se orientan paralelas entre sí y perpendiculares a la superficie eléctrica (Figura 6), aumentando la eficiencia de hibridación.



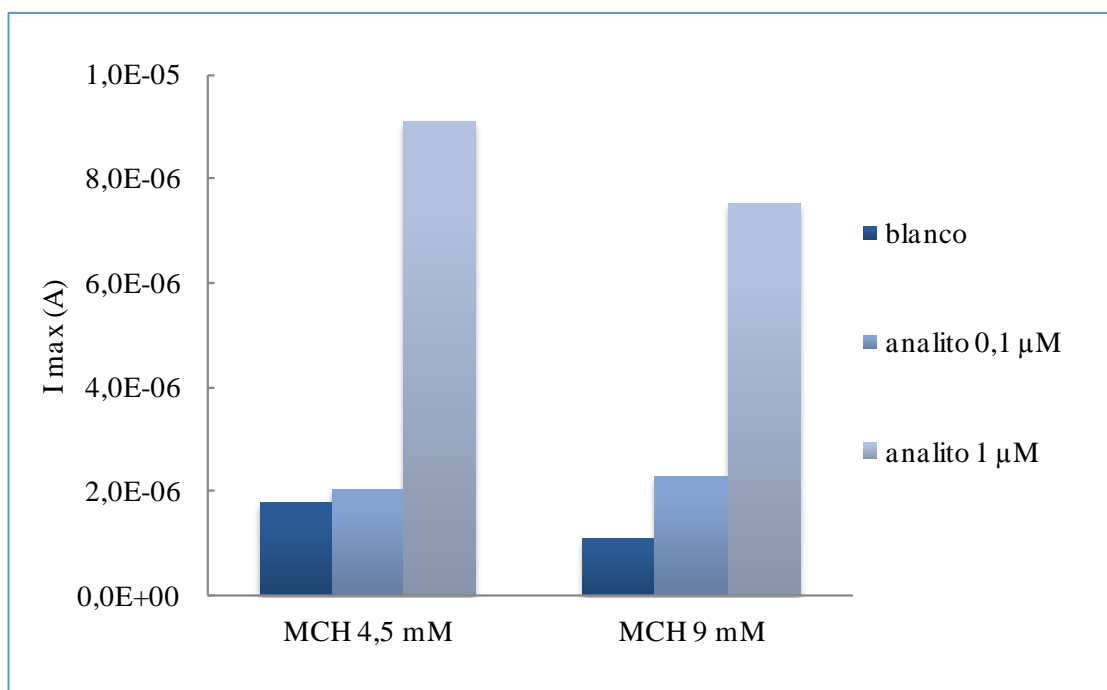
**Figura 5.-** Respuesta del genosensor con ALP-Strp  $8,6 \times 10^{-3}$  g/L. Inlet: Relación  $I_{max}$ -concentración analito.

En la Figura 7, se comparan las respuestas obtenidas con sensores que contienen 4,5 mM y 9 mM de MCH. Al aumentar la concentración de MCH se observa un descenso de la señal generada por el blanco que permite detectar 0,1  $\mu$ M de analito.

Aunque el aumento de la concentración de MCH mejora la relación señal/ruido, deben estudiarse más a fondo las características de la monocapa formada sobre el electrodo en estas condiciones. La densidad de sonda inmovilizada es un factor decisivo en la eficiencia de la reacción de hibridación.



**Figura 6.-** Formación de monocapa autoensamblada mixta con MCH en electrodos de oro.



**Figura 7.-** Efecto de la concentración MCH sobre la intensidad de corriente.

Para obtener información acerca de la densidad de empaquetamiento de la monocapa, se estudió el comportamiento electroquímico de distintas especies electroactivas neutras, para evitar posibles interacciones electrostáticas, como hidroquinona (HQ), ferrocianuro y 1-naftol mediante voltamperometría cíclica (-0,3 V a +0,6 V  $v_{\text{barrido}} = 50 \text{ mV/s}$ ).

### 3.5.1. Hidroquinona

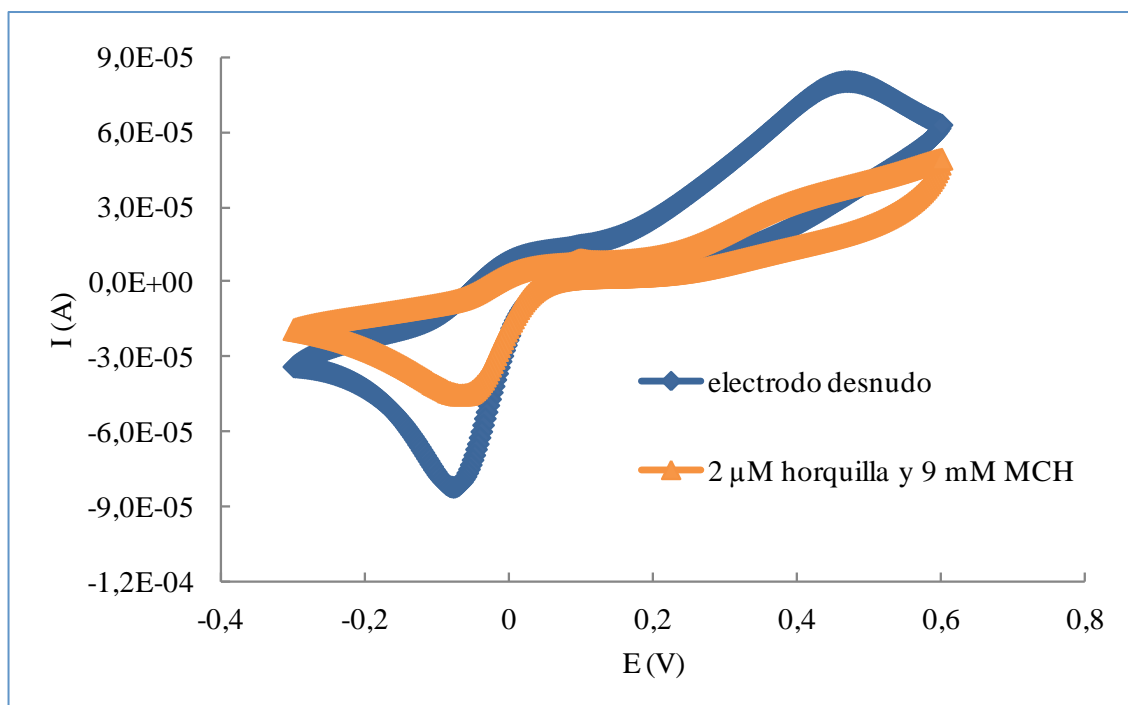
El proceso redox de la HQ se ve modificado respecto al electrodo desnudo al inmovilizar sobre la superficie del electrodo sólo MCH de 1 a 9 mM, sólo horquilla 0,02 μM a 2 μM o ambos simultáneamente.

Este cambio se acentúa a medida que aumenta la complejidad de la monocapa observándose un descenso en la intensidad y un aumento del carácter irreversible del proceso redox.

La presencia de MCH, independientemente de su concentración, cambia el perfil redox de la HQ. Por el contrario, la presencia de la sonda de captura solo afecta al comportamiento de la HQ a partir de 0,2 μM. Debido a que interesa inmovilizar la mayor cantidad posible de sonda (horquilla), ya que la hibridación en superficie se encuentra más dificultada que la homogénea (hibridación disolución), se seleccionó una concentración 2 μM de sonda de captura.

Tal y como se muestra en la Figura 8, el cambio en el comportamiento electroquímico de la HQ una vez formada la monocapa (2 μM horquilla y 9 mM MCH) demuestra el adecuado recubrimiento del electrodo. El desplazamiento de

los potenciales se atribuye a la orientación de la HQ en la monocapa, que favorece su proceso redox.

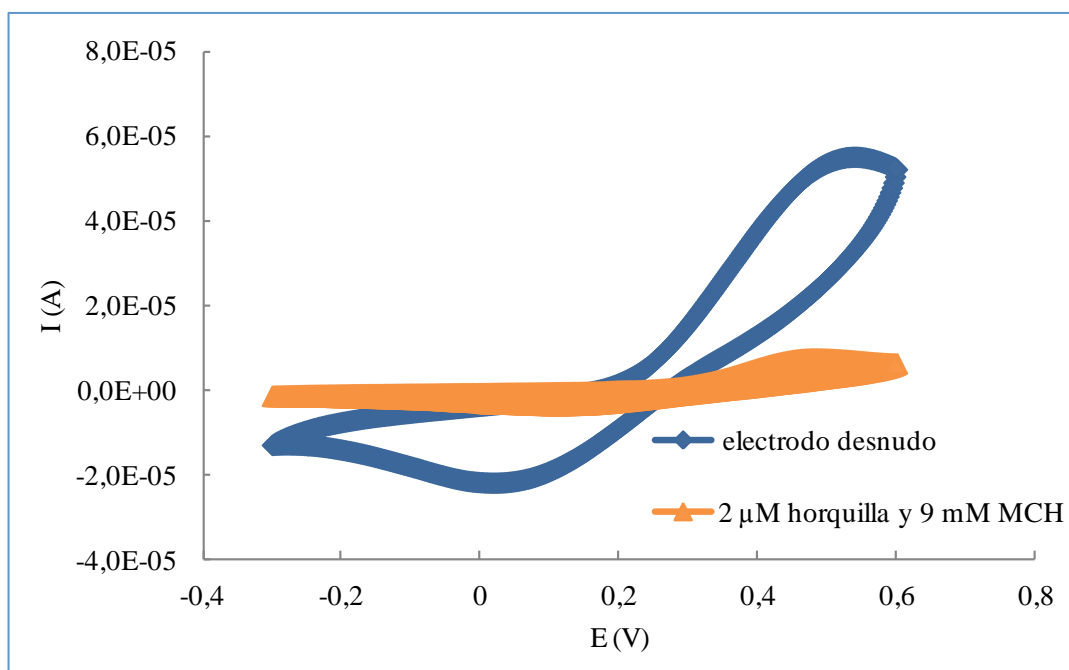


**Figura 8.** - Voltamperometría cíclica de hidroquinona sobre electrodo desnudo y modificado.

### 3.5.2. Ferrocianuro

El ferrocianuro es una molécula algo más compleja que la HQ, electroactiva, cuyo proceso redox reversible es muy conocido, y no se ve tan afectada por cambios de pH (18). En esta experiencia se procedió de igual forma que en el caso de la HQ.

En la Figura 9, se muestra el comportamiento redox del ferrocianuro (0,5 mM) en el electrodo desnudo, con un potencial de oxidación a  $\sim 0,5$  V e intensidad aproximada de  $50 \mu\text{A}$ . Al modificar el electrodo con horquilla  $2 \mu\text{M}$  disminuyen las intensidades de los picos anódico y catódico como con la HQ, pero, a diferencia de la HQ aumenta la diferencia entre potenciales, ya que esta molécula no es tan fácil de orientar como aquella dentro de la monocapa. Este cambio se acentúa en presencia de la monocapa mixta, observándose un recubrimiento efectivo al utilizar  $2 \mu\text{M}$  de horquilla y  $9 \text{ mM}$  de MCH.



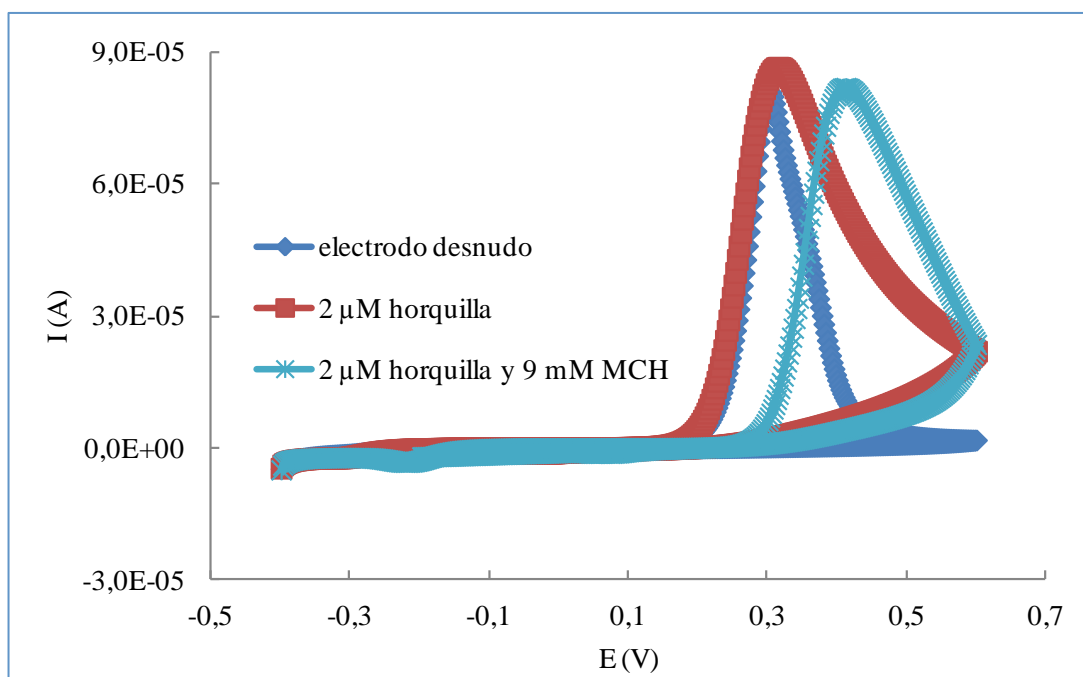
**Figura 9.-** Voltamperometría cíclica de ferrocianuro potásico sobre electrodo desnudo y modificado.

### 3.5.3. Naftol

Por último, se estudió el comportamiento electroquímico del 1-naftol (2 mM) en función de la complejidad de la monocapa por tratarse de la especie electroactiva utilizada en el genosensor propuesto. En esta experiencia se ensayaron dos configuraciones de sonda de captura tipo horquilla y lineal con la misma secuencia de nucleótidos. También se comprobó que el sustrato enzimático 1-naftilfosfato, no sufre proceso alguno sobre el electrodo.

En la Figura 10, se aprecia que en un electrodo modificado con horquilla el paso del naftol se ve dificultado requiriendo mayor potencial de oxidación que en el electrodo desnudo. Al inmovilizar tanto sonda como MCH el potencial requerido fue aún mayor.

Posteriormente, se procedió a la modificación de los electrodos con 2  $\mu\text{M}$  de horquilla y concentraciones variables de MCH, dado que este último es el responsable de la organización de la monocapa y de la orientación vertical de las hebras de ADN sobre la superficie electródica, contribuyendo a la orientación del 1-naftol y su adsorción al electrodo.



**Figura 10-** Voltamperometría cíclica de 1-naftol sobre electrodo desnudo y modificado.

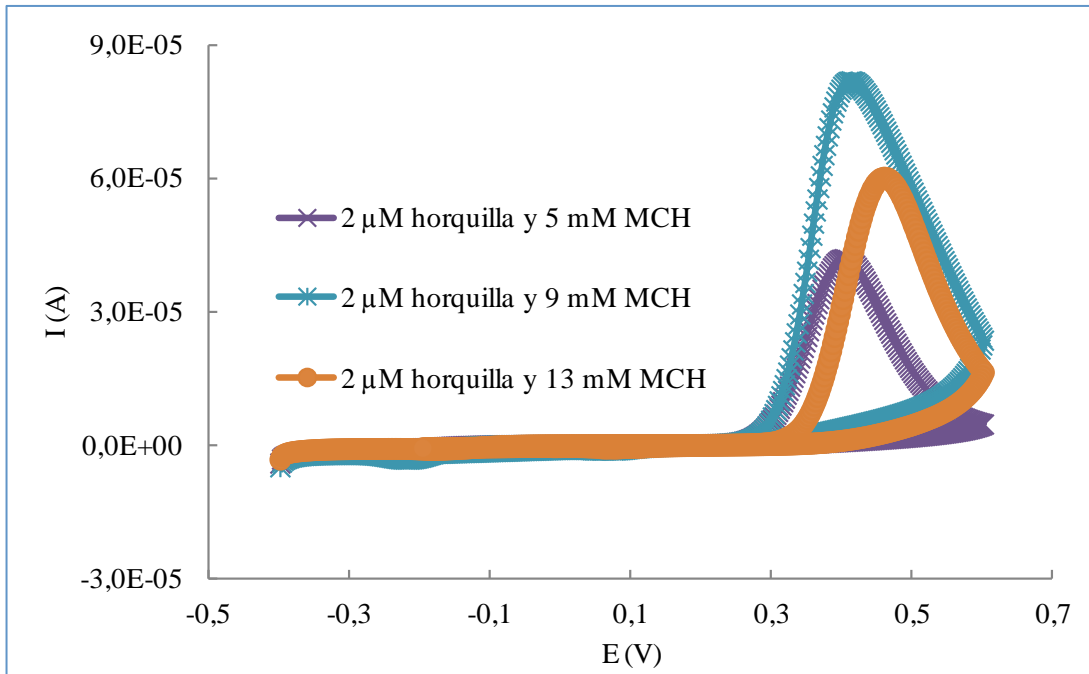
Como se muestra en la Figura 11, al aumentar la concentración de MCH el potencial de oxidación aumenta. La máxima intensidad se obtuvo con 9 mM de MCH y 2  $\mu$ M de hoquilla, disminuyendo al utilizar MCH 13 mM, debido a que la monocapa formada es tan compacta que el paso del 1-naftol se ve muy dificultado. Con concentraciones inferiores a 9 mM de MCH se obtiene una monocapa desorganizada, disminuyendo la capacidad del 1-naftol de intercalarse y adsorberse en el electrodo.

Por ello, se seleccionó 9 mM como concentración óptima de MCH para obtener una monocapa mixta organizada y así conseguir la máxima señal analítica.

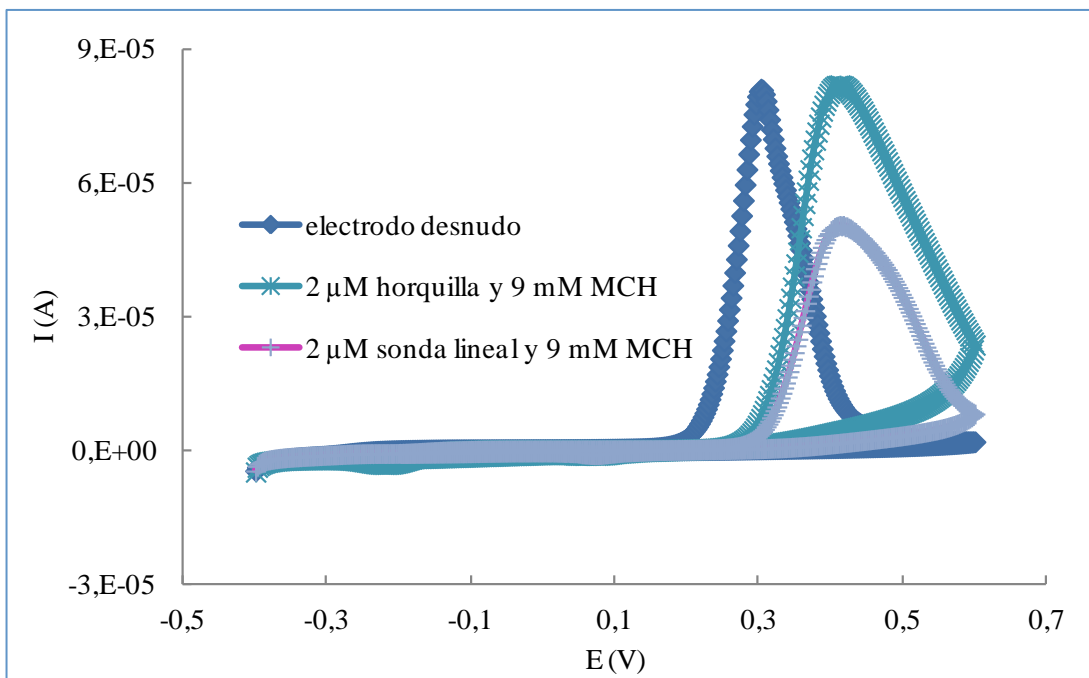
La sonda lineal provocó el mismo cambio en el potencial del pico de oxidación del 1-naftol respecto al electrodo desnudo (Figura 12), pero la intensidad sufrió un descenso significativo.

### 3.6. Optimización de la fase de medida

Una vez definidas las concentraciones óptimas de sonda de captura y de MCH, se procedió a la optimización de la fase de medida con el objetivo de mejorar la sensibilidad y disminuir la señal del blanco.



**Figura 11.-** Voltamperometría cíclica con 1-naftol para electrodos modificados con fase sensora.



**Figura 12.-** Voltamperometría cíclica con 1-naftol para electrodos preparados con sonda horquilla y sonda lineal.

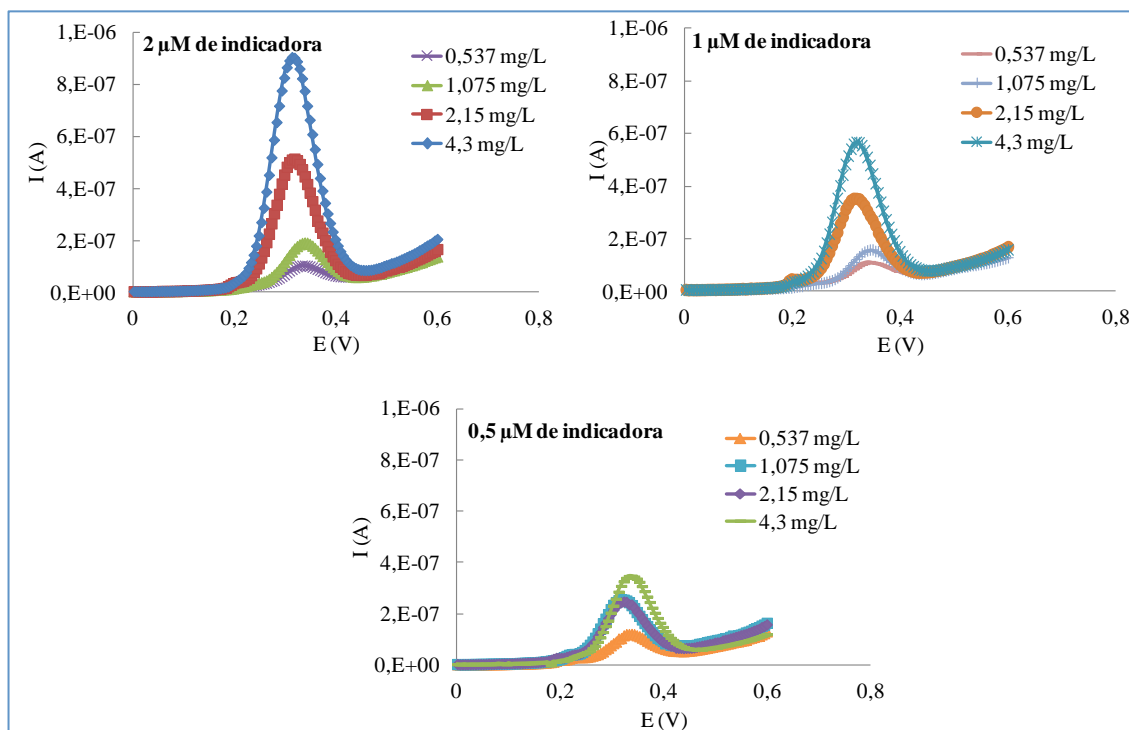


Se estudió la influencia de la concentración de sonda indicadora y conjugado enzimático ya que el ruido se debe fundamentalmente a la adsorción inespecífica de ambas especies. La primera se encuentra sobre la superficie electródica durante la etapa de hibridación heterogénea siendo probable su adsorción al electrodo a través de sus bases nitrogenadas. Algo similar puede ocurrir con la enzima añadida al medio catalizar la conversión del sustrato enzimático a producto electroactivo.

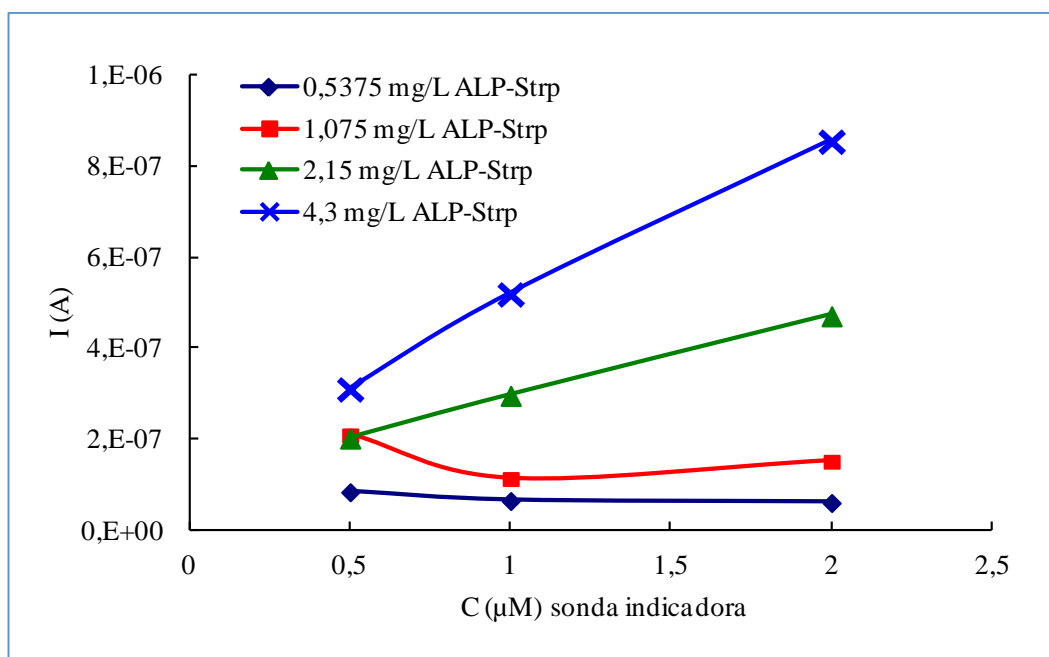
Se estudiaron conjuntamente tres niveles de concentración de sonda indicadora (2, 1 y 0,5  $\mu\text{M}$ ) y cuatro niveles de enzima ALP-Strp ( $4,3 \cdot 10^{-3}$  g/L;  $2,15 \cdot 10^{-3}$  g/L;  $1,075 \cdot 10^{-3}$  g/L y  $5,375 \cdot 10^{-4}$  g/L).

La intensidad del blanco se hace menor conforme disminuye la concentración de sonda indicadora y de enzima siendo el efecto de ésta más pronunciado (Figura 13).

Como se observa en la Figura 14, el blanco dio la mínima señal en presencia de la menor concentración de enzima estudiada ( $5,375 \cdot 10^{-4}$  g/L). Sin embargo, en estas condiciones la señal del blanco no se vio afectada por la concentración de sonda indicadora. Según estos resultados, el efecto de la sonda indicadora en el ruido parece menor que el de la enzima.



**Figura 13.-** Influencia de la adsorción inespecífica de la enzima en el ruido de fondo.

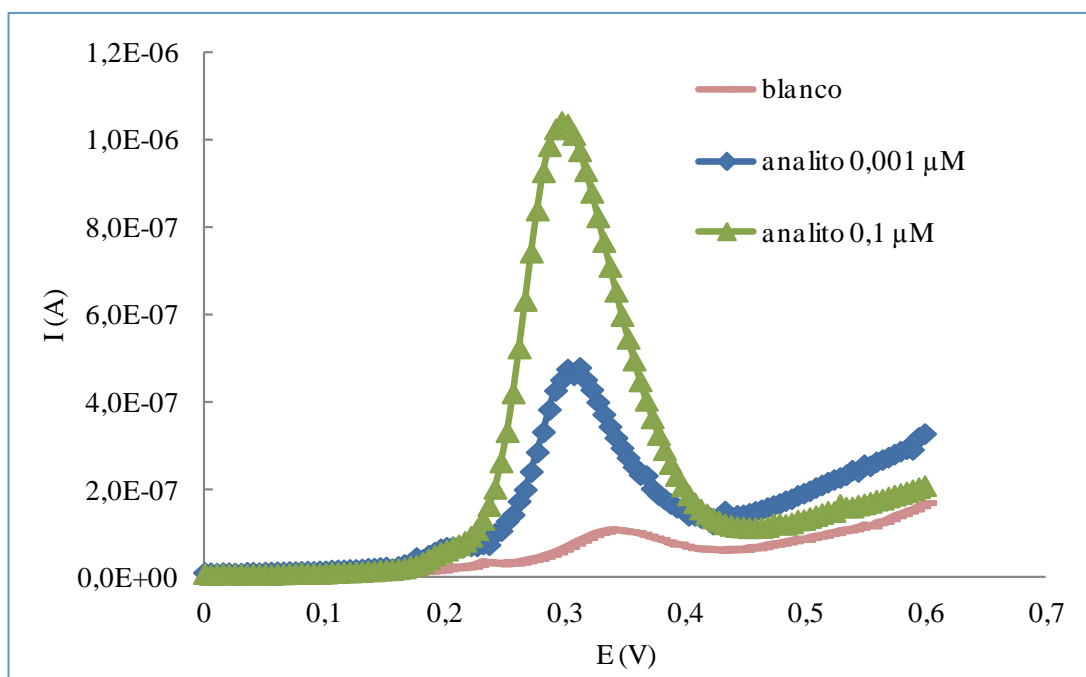


**Figura 14.-** Influencia de sonda indicadora en la señal blanco para diferentes concentraciones de enzima.

Disminuir la cantidad de estos reactivos podría afectar a la sensibilidad del ensayo ya que constituyen dos de las etapas clave del marcaje y amplificación de la reacción de hibridación. Es necesario llegar a una situación de compromiso en donde la intensidad del blanco sea lo menor posible, sin disminuir la intensidad que origina el analito.

La experiencia siguiente, se realizó para evaluar si las condiciones experimentales óptimas permitían la determinación de diferentes concentraciones de analito. Se seleccionó una concentración de sonda indicadora de 1  $\mu\text{M}$ , en exceso respecto al analito. Para esta concentración de sonda, la intensidad generada por el blanco fue similar cuando las concentraciones de enzima fueron  $5,375 \cdot 10^{-4}$  g/L y  $1,075 \cdot 10^{-3}$  g/L. Para asegurar que el conjugado enzimático no fuera un reactivo limitante del diseño se tomó como valor de estudio  $1,075 \cdot 10^{-3}$  g/L.

En la Figura 15, se muestra la respuesta de distintas concentraciones de analito en estas condiciones experimentales. Se observa una gran diferencia entre el blanco y 0,001  $\mu\text{M}$  de analito.



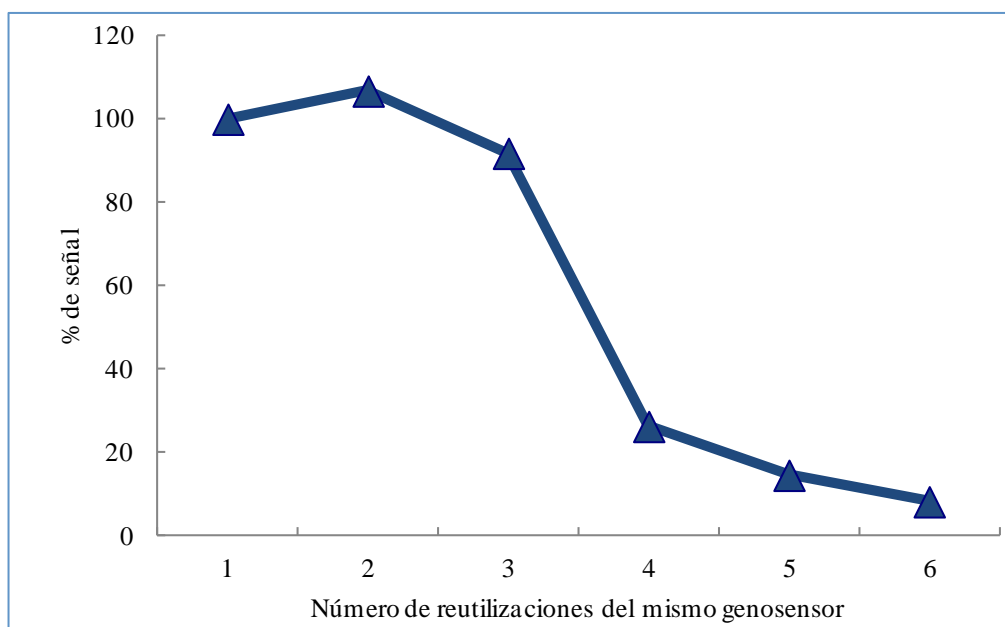
**Figura 15.-** Voltamperogramas obtenidos en condiciones óptimas:  $1\mu\text{M}$  de sonda indicadora y  $1,075\cdot 10^{-3}$  g/L de enzima.

### 3.7. Respuesta del genosensor

Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se procedió a evaluar la respuesta del genosensor propuesto.

Se evaluó la precisión del método en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

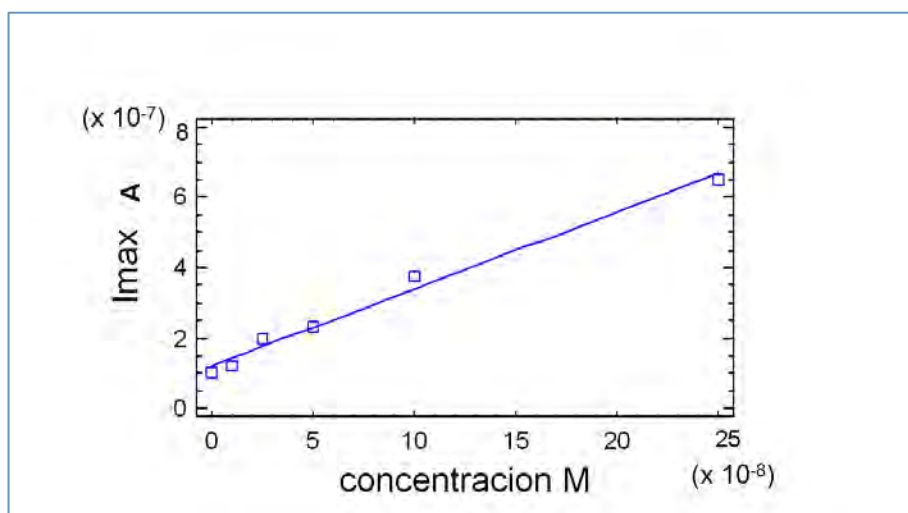
Se realizaron estudios de repetibilidad utilizando un mismo genosensor para la realización de determinaciones de analito sucesivas, tras una etapa de lavado con buffer 2x SSPE. En la Figura 16 se aprecia una disminución del 80% de la intensidad de corriente en la cuarta utilización del dispositivo, y de hasta el 95% en la sexta medida, lo que sugiere la formación, por parte del producto de oxidación electroquímica del 1-naftol, de una capa polimérica pasivante sobre la superficie del electrodo limitándolos a un solo uso. La formación del polímero a partir del 1-naftol oxidado desactiva la superficie electroquímica, efecto que se acentúa al realizar medidas sucesivas, lo cual no es un inconveniente importante teniendo en cuenta el carácter desechable del formato de los electrodos utilizados (serigrafiados de bajo coste).



**Figura 16.-** Respuesta en función del número de utilizaciones de un mismo genosensor.

Para el estudio de reproducibilidad, se prepararon seis genosensores y se midió la señal generada por una disolución de analito  $0,1 \mu\text{M}$ . Se obtuvo un coeficiente de variación del 22,92% ( $n=6$ ) en las medidas de intensidad, que interpretamos como una reproducibilidad aceptable, pero susceptible de mejora.

Utilizando las condiciones óptimas de la fase sensora y etapa de medida, se obtuvo respuesta lineal hasta una concentración de analito de  $250 \text{ nM}$  como se observa en la Figura 17. La relación entre la intensidad de corriente y la concentración de analito para un intervalo de concentraciones comprendido entre  $20 \text{ nM}$  y  $250 \text{ nM}$  viene dada por la siguiente ecuación:  $I_{\text{max}} (A) = 1,21467 \cdot 10^{-7} + 2,18207 \times \text{concentraci3n } (M) \quad r = 0,994$



**Figura 17.-** Curva de calibrado con condiciones óptimas.

#### 4. CONCLUSIONES

El genosensor electroquímico propuesto para la detección de gluten basado en un ensayo tipo sándwich, se fabricó sobre un electrodo de oro serigrafiado mediante la formación de una monocapa autoensamblada mixta. Una vez optimizadas todas las condiciones experimentales implicadas en el diseño del genosensor y en la etapa de medida se obtuvo una señal analítica proporcional a la concentración de analito lo que demuestra la validez del genosensor propuesto.

#### 5. REFERENCIAS

1. Qiao, S.W., Bergseng, E., Molberg, O., Xia, J., Fleckenstein, B., Khosla, C., & Sollid, L.M. (2004). Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *Journal of Immunology*, 173(3), 1757-1762.
2. Beissbarth, T., Tye-Din, J.A., Smyth, G.K., Speed, T.P., & Anderson, R.P. (2005). A systematic approach for comprehensive T-cell epitope discovery using peptide libraries. *Bioinformatics*, 21(1), 129-137.
3. González, J.M, García, E., Fernández, J.L., Gago, L., & Benito, J. (2007). *Técnicas analíticas para la detección de gluten en alimentos* (pp. 3-81). Informe de vigilancia tecnológica. CEIM. Dirección General de Universidades e Investigación.  
[http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt9\\_deteccion\\_gluten\\_alimentos.pdf](http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt9_deteccion_gluten_alimentos.pdf)
4. Reglamento CE 41/2009 de la Comisión de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de los productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten (D.O.U.E. 21.1.2009). Corrección de errores (D.O.U.E. 1.7.2009).
5. Mujico, J.R., Lombardia, M., Mena, M.C., Méndez, E., & Albar J.P. (2011). A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. *Food Chemistry*, 128(3), 795-801.
6. Debnath, J., Martin, A., & Gowda, L.R. (2009). A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: implications for gluten-free labeling. *Food Research International*, 42(7), 782-787.
7. Zeltner, D., Glomb, M.A., & Maede, D. (2009). Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. *European Food Research Technology*, 228(3), 321-330.
8. Sandberg, M., Lundberg, L., Ferm, M., & Yman, I.M. (2003). Real-time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *European Food Research Technology*, 217(4), 344-349.
9. Wieser, H. (2008). Detection of gluten. En E. K. Arendt & F. D. Bello (Eds.), *Gluten-Free Cereal Products and Beverages* (pp. 47-80). Irlanda: Elsevier.
10. Teles F.R.R., & Fonseca L.P. (2008). Trends in DNA biosensors. *Talanta*, 77(2), 606-623.
11. Pividori M.I., Merkoçi A., & Alegret S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosensors & Bioelectronics*, 15(5-6), 291-303.
12. Bertia F., Laschia S., Palchettia L., Rossierb J.S., Reymond F., Mascini M., & Marrazza G. (2009). Microfluidic-based electrochemical genosensor coupled to magnetic beads for hybridization detection. *Talanta*, 77(3), 971-978.
13. Miranda-Castro R., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Ordieres A.J., & Tuñón-Blanco P. (2009). Stem-Loop DNA probes for the voltammetric determination of *Legionella pneumophila* on disposable screen-printed gold electrodes. *Electroanalysis*, 21(3-5), 267-273.

14. Carpini G., Lucarelli F., Marrazza G., & Mascini M. (2004). Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. *Biosensors & Bioelectronics*, 20(2), 167-175.
15. Miranda-Castro R., de-los-Santos-Álvarez P., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Ordieres A.J., & Tuñón-Blanco P. (2007). Hairpin-DNA probe for enzyme-amplified electrochemical detection of *Legionella pneumophila*. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4050-4055.
16. *Basic Local Alignment Search Tool*; [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)
17. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406-3415.
18. McEwen, G., Chen, F., & Zhou, A. (2009). Immobilization, hybridization and oxidation of synthetic DNA on gold surface: electron transfer investigated by electrochemistry and scanning tunneling microscopy. *Analytical chimica acta*, 643(1-2), 26-37.
19. García-González R., Abedul-Fernández M.T., Pernía A., & Costa-García A. (2008). Electrochemical characterization of different screen-printed gold electrodes. *Electrochimica acta*, 53(8), 3242-3249.
20. Levicky R., Herne T.M., Tarlov, M.J., & Satija S.K. (1998). Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers in gold: A Neutron Reflectivity Study. *Journal of the American Chemical Society*, 120(38), 9787-9792.

### **NOTA DEL EDITOR**

Este trabajo obtuvo el Premio FAES-FARMA en el concurso científico 2011 de la Real Academia Nacional de Farmacia.





## Potenciación de la actividad antitumoral de doxorrubicina mediante su formulación en nanoplataformas magnéticas

José Luis Arias Mediano, Eva Antonia Sáez Fernández, María Adolfinia Ruiz Martínez, Visitación Gallardo Lara

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071 Granada. Spain.

e-mail: [jlarias@ugr.es](mailto:jlarias@ugr.es)

### RESUMEN

El diseño de sistemas transportadores basados en nanopartículas magnéticas pretende la acumulación en el tejido tumoral de la dosis de fármaco administrada. Así debe obtenerse una mejora significativa del efecto anticanceroso, junto con la minimización de la toxicidad asociada. En este contexto, desarrollamos una metodología reproducible de formulación de nanopartículas constituidas por núcleos de óxido de hierro (magnetita) embebidos en una matriz de poli( $\epsilon$ -caprolactona). La extensa caracterización fisicoquímica de estos nanocompuestos permitió definir las condiciones óptimas de formulación para asegurar el transporte eficaz de fármacos. Se estudió la capacidad de la nanoplataforma para desarrollar un efecto antitumoral de hipertermia, su compatibilidad sanguínea y su utilización por vía intravenosa como sistema transportador de doxorrubicina hasta el tejido canceroso. Las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) presentaron una adecuada vehiculización de este fármaco, junto con una muy significativa susceptibilidad magnética. Finalmente, se analizó la actividad antitumoral de los nanocompuestos cargados con doxorrubicina en un modelo de tumor subcutáneo EMT6 inducido en ratones. Se observó que éstos presentaban un marcado efecto quimioterápico en comparación con tratamientos alternativos (p.ej., la administración de estas nanopartículas sin guiado magnético hasta la masa tumoral, o el tratamiento con una solución intravenosa de doxorrubicina). Los resultados obtenidos resaltan las interesantes propiedades que presenta la nanoformulación diseñada para el desarrollo de una terapia eficaz contra el cáncer.

**Palabras clave:** Cáncer; Hipertermia; Nanopartículas compuestas; Nanopartículas magnéticas; Transporte de fármacos.

## **ABSTRACT**

### *Improvement of the antitumor activity of doxorubicin by the use of magnetic nanoplatforms*

The introduction of magnetic nanoplatforms in the cancer arena is intended to optimize the accumulation of the drug dose into the tumor interstitium with the help of a magnetic gradient. As a result, the chemotherapeutic agent may exhibit an enhanced anticancer efficacy and a negligible systemic toxicity. In these contexts, we have developed a reproducible methodology for the design of magnetite/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) core/shell nanoparticles. A detailed physicochemical characterization of these nanocomposites suggested that their heterogeneous structure allows their use in drug delivery, thanks to an excellent responsiveness to magnetic gradients. In vitro heating characteristics (hyperthermia inducing capability) of the core/shell nanoparticles were investigated in a high frequency alternating magnetic gradient. Blood compatibility of the nanoformulation was defined in vitro. Finally, this nanodevice was used to enhance the intravenous delivery of the anticancer agent doxorubicin to the tumor tissue. The nanocomposites were characterized by an adequate doxorubicin loading, a significant magnetic susceptibility, and a low burst drug release. When injected to the EMT6 subcutaneous mice tumor model, these doxorubicin-loaded core/shell nanoparticles were magnetically guided, and they displayed considerably greater anticancer activity than the other anticancer treatments (i.e., doxorubicin-loaded nanocomposites non-magnetically guided, or doxorubicin free in solution). Thus, the here-described stimuli-sensitive nanomedicine possesses important characteristics for effective therapy of cancer.

**Keywords:** Cancer; Drug delivery; Hyperthermia; Magnetic nanoparticles; Nanocomposites.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La necesidad de encontrar tratamientos quimioterápicos eficaces ha hecho que se incrementen las líneas de investigación en esta materia. Esto ha permitido un mayor conocimiento de los orígenes moleculares del cáncer, con la consiguiente identificación de novedosas aproximaciones terapéuticas y el desarrollo de un amplio arsenal de moléculas antitumorales. Sin embargo, los agentes quimioterápicos utilizados en clínica suelen presentar importantes limitaciones que determinan el habitual fracaso del tratamiento incluso en aquellos tipos de cáncer teóricamente más sensibles (1). Un claro ejemplo lo constituye la baja respuesta global ( $\approx 10\%$ ) alcanzada con la utilización de 5-fluorouracilo en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado. Además, se ha descrito que la

combinación de este agente con otros anticancerosos sólo permite mejorar la eficacia antitumoral  $\approx 45\%$  de los casos (2).

Entre las principales razones que justifican el fracaso del tratamiento antitumoral destacan (3): i) la farmacocinética desfavorable del agente anticanceroso (rápido aclaramiento plasmático, rápida biodegradación y corta semivida plasmática) determina el uso de dosis altamente tóxicas y una rigurosa pauta de tratamiento para conseguir el efecto terapéutico deseado; ii) la extensa biodistribución y extravasación de la molécula antitumoral en zonas no deseadas determina una elevada toxicidad; iii) la selectividad del fármaco por las células malignas generalmente es muy pobre; iv) la susceptibilidad de desarrollar resistencia a los anticancerosos por parte de las células tumorales; y, v) las propiedades fisicoquímicas desfavorables de los agentes quimioterápicos, por ejemplo su hidrofobia, induce una escasa acumulación en el lugar de acción.

Con el objetivo de solucionar estos problemas se han asociado moléculas antitumorales con coloides para el tratamiento del cáncer. Esta asociación pretende aumentar la acumulación específica del fármaco en la zona tumoral, e incrementar el tiempo de exposición de las células cancerosa al principio activo (3, 4). De esta manera, numerosas investigaciones han perseguido la formulación de coloides, basados principalmente en nanomateriales vesiculares o poliméricos, para conseguir el transporte eficaz de cualquier antitumoral a la zona diana (1, 3-5). Sin embargo, recientes estudios han probado que esta simple asociación no siempre resulta suficiente para dirigir específicamente un fármaco a cualquier zona del organismo, más allá de los órganos pertenecientes al sistema retículo endotelial (3). Este hecho ha determinado que las investigaciones científicas en este terreno se hallan enfocado al diseño de nanopartículas según novedosas estrategias de transporte pasivos de fármacos (basadas en el efecto de permeación y retención incrementada propio de la masa tumoral) y de transporte activo de fármacos (fundamentadas en interacciones ligando-receptor, y en el uso de nanomateriales sensibles a estímulos externos) (3, 4).

Quizás los coloides magnéticos sean uno de los sistemas que más interesantes posibilidades ofrece en el transporte y liberación controlada de fármacos antitumorales. De forma general, las nanopartículas magnéticas están constituidas por un núcleo magnético englobado en una matriz orgánica (p.ej., un polímero) o inorgánica (p.ej., sílice). Se ha descrito que las características de estos coloides pueden modificarse mediante un procedimiento de síntesis adecuado para definir unas propiedades fisicoquímicas y una capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados, que permitan controlar eficazmente su distribución (y así la del fármaco vehiculizado) hasta el tejido tumoral (6). Los coloides magnéticos presentan numerosas posibilidades en biomedicina ya que pueden (6-9): i) ser visualizados mediante resonancia magnética nuclear y, por lo

tanto, ser utilizados como agentes de contraste debido a su capacidad para reducir los tiempos de relajación  $T1^*$ ,  $T2^*$ ; ii) transportar y acumular un fármaco en el lugar diana mediante la utilización de un gradiente magnético adecuado, aumentando el tiempo de exposición de las células diana al agente quimioterápico; y, iii) producir un efecto de hipertermia en el lugar deseado, ya que generan calor bajo la acción de un gradiente electromagnético alterno.

En el presente trabajo describimos una metodología de síntesis reproducible para la formulación de nanopartículas constituidas por núcleos de óxido de hierro (magnetita) embebidos en una matriz de poli( $\epsilon$ -caprolactona), como sistemas transportadores del agente quimioterápico doxorubicina. A pesar de su notable actividad antitumoral, la utilización clínica de esta antraciclina se encuentra seriamente limitada por sus importantes efectos adversos (p.ej., cardiotoxicidad severa) y por el desarrollo de resistencias por las células tumorales (10, 11). La extensa caracterización fisicoquímica a realizar de los nanocompuestos magnéticos permitirá optimizar la eficacia de la estrategia de síntesis desarrollada. La compatibilidad sanguínea de las nanopartículas se investigó *in vitro* en muestras de sangre mediante el análisis del efecto que ejerce el coloide magnético sobre los procesos de hemólisis, activación plaquetaria y activación del complemento. Se analizaron dos estrategias de vehiculización de doxorubicina: adsorción superficial e incorporación en matriz (absorción), así como los principales factores implicados en el proceso, utilizando para ello la técnica de espectrofotometría ultravioleta-visible. A continuación, se investigó *in vitro* el proceso de liberación de doxorubicina desde las nanopartículas. El estudio de las propiedades magnéticas de los nanocompuestos permitió definir su capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados y de desarrollar un efecto antitumoral de hipertermia. Finalmente, se analizó la actividad anticancerosa de las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) cargadas con doxorubicina en un modelo de tumor subcutáneo EMT6 inducido en ratones.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Material**

Todos los reactivos químicos utilizados tenían calidad analítica (Sigma-Aldrich, Alemania). El agua utilizada en los experimentos fue desionizada y filtrada previamente con un sistema Milli-Q Academic (Millipore, Francia).

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Síntesis de las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona)**

La síntesis que proponemos está basada en el método de disposición interfacial de la poli( $\epsilon$ -caprolactona), utilizado en la síntesis de nanopartículas de este polímero (véanse, p.ej., las referencias 12 y 13). Básicamente, se trata de

provocar la precipitación de la poli( $\epsilon$ -caprolactona) en un medio acuoso que contiene los núcleos del óxido de hierro (magnetita), para que así éstos queden embebidos en la matriz polimérica que se genera. Las nanopartículas de magnetita que constituyen los núcleos magnéticos de los nanocompuestos se prepararon según el método de co-precipitación en solución (14).

El proceso de síntesis de las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) comienza con la adición de 10 mL de una solución al 0,3 % (p/v) de polímero en diclorometano sobre 50 mL de una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita (0,3 %, p/v) que contiene una concentración de pluronic® F-68 del 2 % (p/v). La adición de la fase orgánica sobre la fase acuosa se realizó bajo agitación mecánica (1200 rpm), la cuál se mantuvo durante 1 hora más. Finalmente, la limpieza de los nanocompuestos magnéticos obtenidos se realizó mediante sedimentación magnética. Para ello, la suspensión fue sometida a ciclos consecutivos de exposición a un imán de 400 mT durante 5 minutos, procediendo a la eliminación del sobrenadante tras este tiempo, y a la redispersión del sedimento en agua bidestilada. Esta rutina finalizó cuando el sobrenadante obtenido era transparente y presentaba una conductividad < 10  $\mu$ S/cm.

Finalmente, con el objetivo de establecer comparaciones durante la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona), realizamos también la síntesis de nanopartículas de polímero según la metodología indicada en el párrafo anterior, pero sin la utilización de los núcleos de óxido de hierro.

### ***2.2.2. Caracterización de las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona)***

La geometría (forma y tamaño) de las partículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) y magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ ) fue estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) [microscopio STEM PHILIPS CM20, Holanda] y mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución (FeSEM) [microscopio Zeiss DSM 950, Alemania]. La determinación del tamaño de partícula medio ( $\pm$  desviación estándar) se abordó mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS) [Malvern 4700 analyzer, Malvern Instruments, Inglaterra].

La caracterización de las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  además incluyó: difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier, propiedades eléctricas superficiales (electroforesis: dependencia del potencial zeta con el pH y la fuerza iónica) y termodinámica superficial (análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba). En primer lugar, realizamos un difractograma de rayos X de los tres tipos de nanopartículas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , PCL y  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ ), empleando el método de Debye-Scherrer. El dispositivo utilizado fue un difractómetro Philips

PW1710 (Holanda), y se fijó una longitud de onda de 1,5405 Å (Cu-K $\alpha$ ). La masa utilizada en el análisis fue la misma para todos los materiales (0,5 g).

Para la preparación de las muestras a analizar mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier, tomamos 1 mg de material sólido y lo mezclamos con 100 mg de bromuro potásico pulverizado y seco. A continuación, prensamos el material a 15000 kPa para obtener un disco transparente. La obtención del interferograma se realizó utilizando un espectrofotómetro de infrarrojos (Nicolet 20 SXB, EE.UU.), con una resolución de 2 cm<sup>-1</sup>.

El estudio de las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas (y su estabilidad en el tiempo a pH 7,4) se basó en la técnica de electroforesis. La determinación de las movilidades electroforéticas ( $u_e$ ) de las distintas suspensiones acuosas se llevó a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra). Este tipo de caracterización ya ha sido ampliamente descrita en bibliografía (13, 15, 16). Se utilizó la teoría de O'Brien y White (17) para convertir los valores de  $u_e$  en potencial zeta ( $\zeta$ ). Finalmente, utilizamos la técnica de electroforesis para evaluar la velocidad a la que la PCL se degrada y deja zonas cada vez mayores de magnetita expuestas al medio de dispersión. Las medidas electroforéticas de las suspensiones acuosas de nanopartículas (concentración  $\approx 0,1$  %, p/v) se realizaron reproduciendo las condiciones fisiológicas que se encontrarán éstas tras su administración intravenosa (pH 7,4  $\pm$  0,1, y 37,0  $\pm$  0,5 °C). El experimento se consideró finalizado cuando los valores de  $u_e$  de las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL coincidían con los de la Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, señal inequívoca de la pérdida del recubrimiento polimérico (15).

El análisis termodinámico superficial de las nanopartículas se basó en el modelo desarrollado por van Oss (15, 18).

### ***2.2.3. Propiedades magnéticas y análisis del efecto de hipertermia***

Las propiedades magnéticas de la magnetita y de los nanocompuestos Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL se definen perfectamente mediante el ciclo de histéresis. Esta caracterización macroscópica del comportamiento magnético de los coloides se realizó a 25,0  $\pm$  0,5 °C con la ayuda de un magnetómetro-susceptibilímetro Manics DSM-8 (Francia). Además, la capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados fue analizada cualitativamente mediante visualización del efecto que ejerce un imán permanente en una suspensión de nanopartículas. Para ello, se prepararon sendas suspensiones acuosas con una concentración del 0,1 % (p/v). A una temperatura de 25,0  $\pm$  0,5 °C, se puso en contacto la suspensión de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y la de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL con un gradiente magnético de 400 mT, y se siguió la respuesta de las nanopartículas en función del tiempo. Finalmente, el análisis del comportamiento microscópico de las suspensiones de nanocompuestos se llevó a cabo mediante microscopía óptica (magnificación: 40X), y bajo las mismas

condiciones experimentales ya descritas. Con este objetivo, se depositó una gota de suspensión de nanocompuestos en un portaobjetos y, a continuación, se localizó el imán en diferentes posiciones con respecto a la suspensión.

La capacidad de generar calor de las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL bajo la acción de un gradiente electromagnético alterno se estudió in vitro y por triplicado a 25,0 ± 0,5 °C. Para ello, se prepararon 5 mL de una suspensión acuosa de nanopartículas (10 mg/mL). La frecuencia y la intensidad del gradiente magnético utilizado fueron 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente.

#### **2.2.4. Compatibilidad sanguínea**

Quizás una de las principales dificultades a la hora de abordar el diseño de un coloide para el transporte de fármacos sea su reducida estabilidad en contacto con la sangre y su rápido aclaramiento plasmático por el sistema retículo endotelial. Ambas circunstancias determinan que el coloide no logre mejorar la actividad del fármaco vehiculado (3, 6). Por este motivo, decidimos investigar la interacción que se produce entre las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL y los componentes sanguíneos. Para ello, se tomaron muestras de sangre de cinco mujeres adultas sanas (edad: 28–40 años), las cuáles fueron procesadas según una técnica ampliamente descrita que permite elucidar el efecto que un coloide ejerce sobre los eritrocitos, la coagulación y el sistema del complemento (19, 20). En estos experimentos (realizados por triplicado) se utilizó un tampón fosfato salino (PBS) como solución control.

#### **2.2.5. Análisis de la capacidad de vehiculización de doxorrubicina**

El diseño de nanocompuestos Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL con el agente quimioterápico doxorrubicina incorporado se basó en dos metodologías clásicas de vehiculización de fármacos. En concreto: i) la adsorción superficial tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de principio activo (método de adsorción); y, ii) la incorporación del fármaco en el medio donde se generan las nanopartículas, de forma que quede atrapado principalmente en la matriz de éstas (método de absorción). La cuantificación de la vehiculización de doxorrubicina en los nanocompuestos se realizó mediante espectrofotometría ultravioleta-visible. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones molares de fármaco ensayadas (10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-3</sup>). Estas metodologías se encuentran detalladas en diversos trabajos de investigación (véase, p.ej., la referencia 13). La cantidad de fármaco incorporado en los nanocompuestos se expresó en términos de eficacia de atrapamiento (entrapment efficiency, EE) (%) [(fármaco vehiculado (mg) / cantidad total de fármaco utilizada (mg)) x 100] y de carga de fármaco (drug loading, DL) (%) [(fármaco vehiculado (mg) / masa total utilizada de nanopartículas (mg)) x 100].



Los ensayos de liberación in vitro de doxorubicina se realizaron utilizando las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL formuladas bajo las condiciones óptimas de vehiculización de este fármaco (ver sección 3.8.). Este ensayo se realizó por triplicado a 37,0 ± 0,5 °C, utilizando el método de diálisis, y un tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7,4 ± 0,1) como medio de liberación. Brevemente, las bolsas de diálisis (Spectrum® Spectra/Por® 6, EE.UU.) se dejaron sumergidas en agua bidestilada durante 12 horas antes de comenzar el ensayo. Estas bolsas se caracterizan por un tamaño de poro de 2000 Da, que permite retener las nanopartículas en su interior, dejando pasar únicamente la doxorubicina cedida por las nanopartículas hasta el medio de liberación. Las muestras del medio de liberación (1 mL) se recogieron según el siguiente intervalo de tiempos: 0,08, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 12 horas, y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 días. Las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría ultravioleta-visible a la longitud de onda de máxima absorbancia de la doxorubicina (481 nm). Debe tenerse en cuenta que, para mantener las condiciones sink, es preciso reponer el medio de liberación tras cada toma de muestra con un volumen igual de la solución tampón, conservado a la misma temperatura.

#### ***2.2.6. Evaluación de la actividad antitumoral in vivo de las nanopartículas magnetita/poli(ε-caprolactona) con doxorubicina vehiculizada***

En este estudio se investigó la actividad antitumoral que se obtiene tras la administración intravenosa de una suspensión de nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg), las cuáles son guiadas magnéticamente hasta el tejido tumoral mediante un imán permanente de 400 mT. Para ello, se utilizó un modelo de ratones Balb/c con tumor subcutáneo inducido con células murinas EMT6 de cáncer de pulmón.

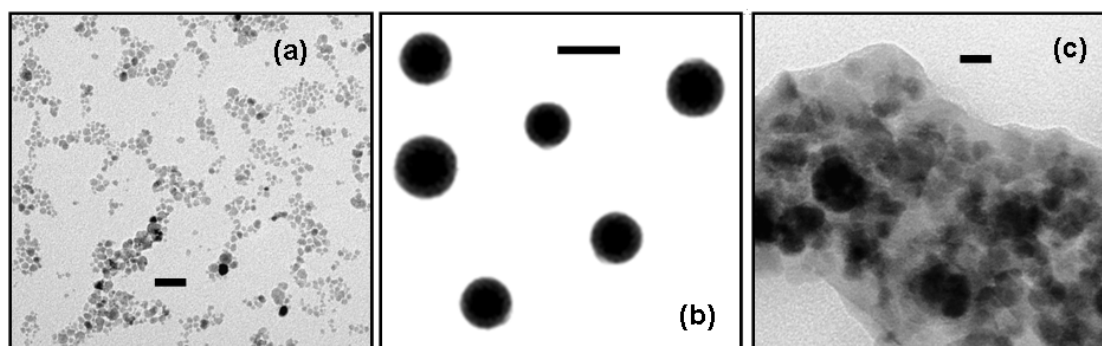
Los experimentos se realizaron según la normativa europea sobre el cuidado y utilización de animales de experimentación. Se utilizaron ratones Balb/c de 4 – 5 semanas de edad y con un peso medio ≈ 15 gramos, los cuáles disponían de agua y comida estándar para ratón ad libitum. El desarrollo del modelo de tumor subcutáneo en los animales implicó la inyección subcutánea (zona dorsal superior derecha) de células murinas EMT6 (10<sup>6</sup> células en una suspensión acuosa de Matrigel™ enriquecida con factores de crecimiento). Una vez que los ratones desarrollaron un tumor subcutáneo palpable (tras 5 días), éstos se dividieron en 6 grupos de tratamiento con 6 animales por grupo. En concreto: grupo control (sin tratamiento), grupo tratado con una solución acuosa de doxorubicina (dosis: 8 mg/Kg), grupo (placebo) tratado con nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL sin fármaco cargado y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT (misma dosis de nanopartículas y esquema de tratamiento), grupo tratado con nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de doxorubicina: 8 mg/Kg) pero sin ser guiadas magnéticamente, y grupo tratado con nanopartículas

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de doxorubicina: 8 mg/Kg) y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT hasta la masa cancerosa. Todos los grupos de ratones (excepto el grupo control) recibieron el mismo esquema de tratamiento: 4 dosis intravenosas de un bolo de las formulaciones (días 6, 9, 13 y 16 tras la implantación del tumor). El imán permanente se localizó directamente sobre el tumor subcutáneo durante 2 horas, a contar desde el momento de administración de las formulaciones. La evaluación de la actividad antitumoral en cada uno de los grupos se realizó mediante medida del volumen de la masa tumoral.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Geometría de las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona)

El examen de las microfotografías electrónicas de transmisión y de barrido, junto con los datos obtenidos del análisis PCS nos permitió definir el tamaño y geometría de las partículas sintetizadas. En el caso de la magnetita, su tamaño medio de  $12 \pm 2$  nm (Figura 1a y 2a) es característico de nanopartículas superparamagnéticas (21). El diámetro medio de las nanopartículas de polímero es de  $97 \pm 7$  nm. En cuanto a las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL, tal y como puede apreciarse en la Figura 1c, cabe decirse que la metodología de síntesis desarrollada permite un recubrimiento polimérico eficaz de los núcleos magnéticos. Es más, cuando los núcleos de magnetita quedan embebidos en la matriz polimérica (Figura 2c), adquieren el aspecto externo de las nanopartículas de polímero (Figura 2b). Finalmente, el análisis PCS de los nanocompuestos confirmó el pequeño tamaño de éstos ( $86 \pm 12$  nm), el cuál es muy adecuado para asegurar una adecuada biodistribución tras ser administrados por vía parenteral (22).



**Figura 1.-** Imágenes de HRTEM de las nanopartículas de magnetita (a), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (b), y magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) (c). Longitud de barra: 100 nm (a y b), y 20 nm (c).

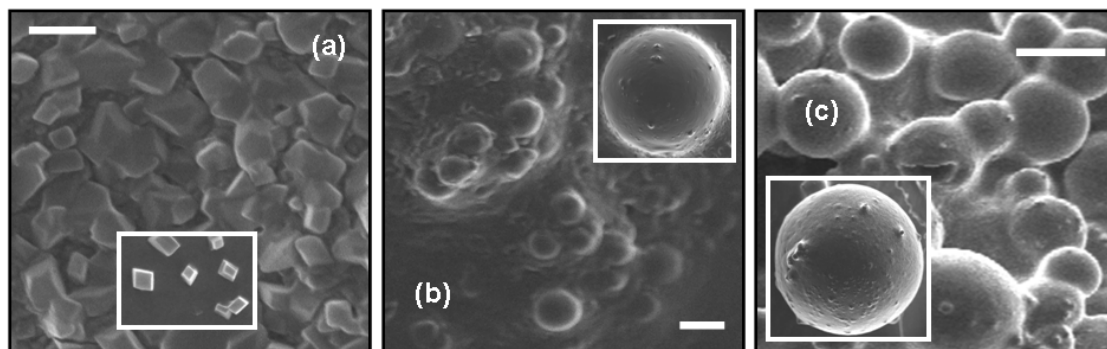
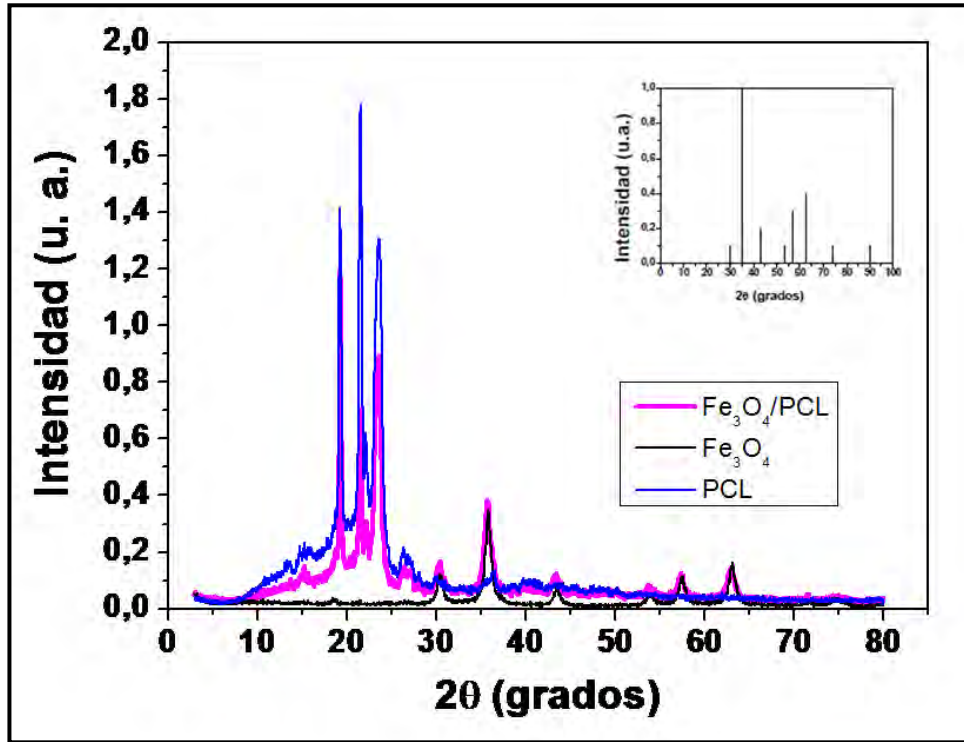


Figura 2.- Imágenes de FeSEM de las nanopartículas de magnetita (a), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (b), y magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) (c). (Figuras insertadas: detalles de cada una de las muestras). Longitud de barra: 20 nm (a), y 100 nm (b y c).

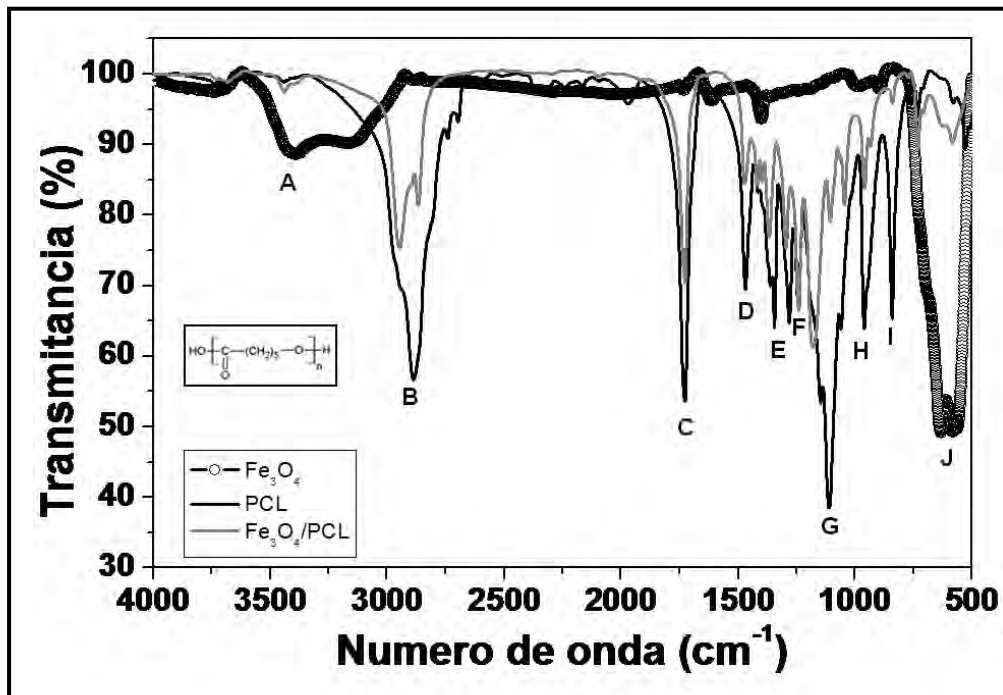
### 3.2. Estructura y composición química

La Figura 3 recoge los difractogramas de rayos X obtenidos para la magnetita, el polímero y los nanocompuestos. Al comparar los difractogramas de la magnetita y de las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  con el patrón de la American Society for Testing and Materials (patrón ASTM) de la magnetita (ver el detalle de la Figura 3), se comprueba la perfecta coincidencia de las líneas de estos difractogramas con las del patrón, lo que permite identificar la muestra como magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta (tamaño de grano  $\approx 300 \text{ \AA}$ ), incluso tras ser recubierta por el polímero. Las características semicristalinas de la PCL (23) quedan también reflejadas en los difractogramas del polímero y los nanocompuestos. Los picos característicos de la PCL se encuentran presentes en el difractograma de las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ , aunque con una menor intensidad. Esto es lógico si consideramos que, a igualdad de masa utilizada en el análisis, la cantidad de polímero presente en la muestra de nanocompuestos debe ser menor. Este análisis constituye una nueva prueba de la eficacia de la técnica desarrollada para la síntesis de los nanocompuestos.

En la Figura 4, se recoge el espectro de infrarrojos de los tres tipos de nanopartículas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , PCL y  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ ). Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia del procedimiento de síntesis de los nanocompuestos, dado que permite la identificación de los grupos funcionales del polímero en éstas. Sin embargo, las bandas son menos intensas como consecuencia de la menor cantidad de polímero presente en las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  para la misma masa de muestra. Cabe destacar además cómo la banda característica de la absorción en la magnetita (banda J,  $581 \text{ cm}^{-1}$ ) (24), correspondiente a la frecuencia Restrahl (o rayo residual) de máxima absorbancia de cristales iónicos (o parcialmente iónicos) en el infrarrojo (25), sólo se encuentra además presente en el espectro de los nanocompuestos.



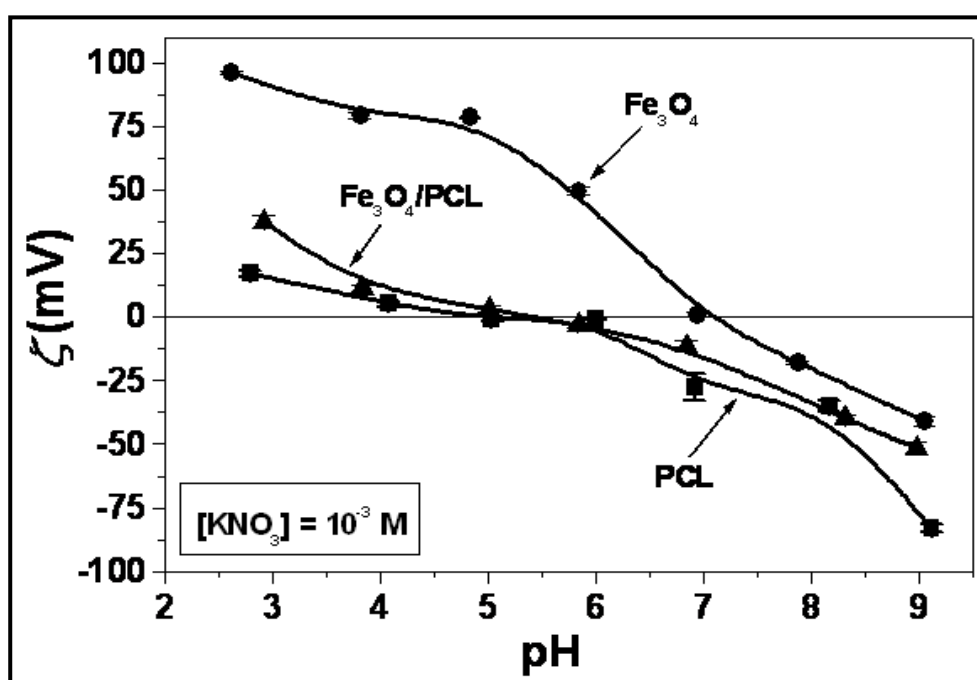
**Figura 3.-** Difractogramas de rayos X de las nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , línea negra), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL, línea azul) y magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ , línea magenta). Figura insertada: patrón ASTM de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . La intensidad se indica en unidades normalizadas.



**Figura 4.-** Espectro de infrarrojos de las nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , -o-), de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL, —) y de magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ , - -). Figura insertada: estructura química de la PCL.

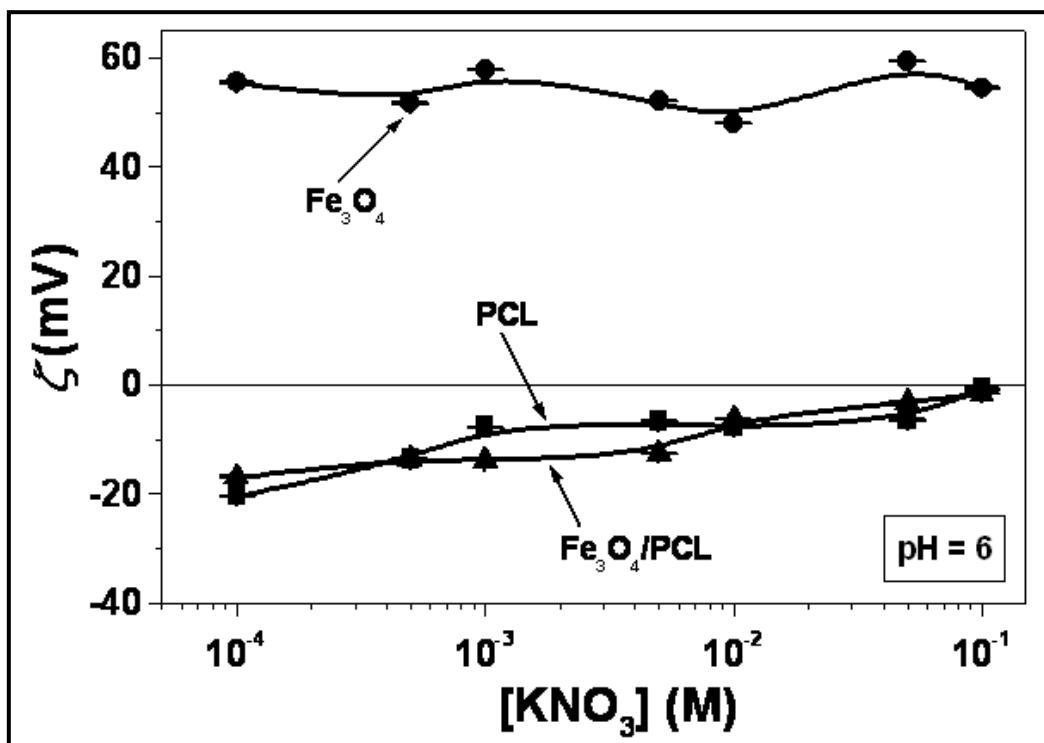
### 3.3. Propiedades eléctricas superficiales

Debido a que las propiedades de los óxidos de hierro son extremadamente sensibles a las variaciones del pH (26), lo cuál no es predecible en el caso de la poli( $\epsilon$ -caprolactona) debido a la naturaleza de los grupos responsables de su carga eléctrica (ácidos carboxílicos libres) (27, 28), centramos en primer lugar nuestro estudio en el análisis del efecto del pH sobre el potencial zeta ( $\zeta$ ) de las nanopartículas. La Figura 5 muestra la evolución del  $\zeta$  de las nanopartículas en función del pH (a fuerza iónica moderada constante:  $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M). Como puede observarse, las nanopartículas de magnetita presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero bien definido  $\approx$  pH 7. Resultado que concuerda con trabajos previamente publicados (15, 26). En el caso del polímero, el punto isoeléctrico se encuentra  $\approx$  pH 5,5. A partir de estos valores, la carga eléctrica superficial de las nanopartículas poliméricas es negativa. Esta diferencia entre el comportamiento electrocinético de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y de PCL convierte a la electroforesis en una herramienta cualitativa muy útil para comprobar la eficacia del recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos. De hecho, la Figura 5 muestra claramente cómo las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  presentan un comportamiento casi idéntico a las de polímero puro. Por lo tanto, podemos concluir que el recubrimiento polimérico oculta muy eficazmente a la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , haciendo que la superficie de los nanocompuestos sea indistinguible de la de las nanopartículas puras de polímero.



**Figura 5.-** Potencial zeta ( $\zeta$ ) de las nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ●), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL, ■), y magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ , ▲) en función del pH, en presencia de  $10^{-3}$  M  $\text{KNO}_3$ .

Para confirmar estos resultados, determinamos el  $\zeta$  de las nanopartículas en función de la concentración de  $\text{KNO}_3$  a pH natural (pH 6) (Figura 6). De nuevo, se observa claramente la similitud entre la electrocinética del polímero y de las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ , y las diferencias con respecto a la magnetita.



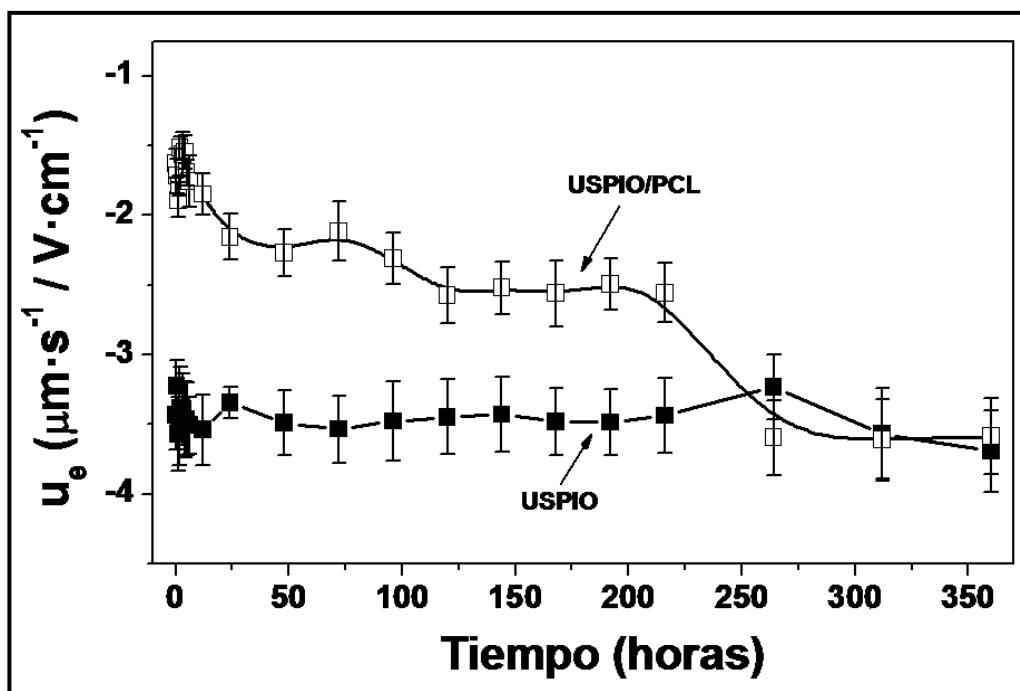
**Figura 6.-** Potencial zeta ( $\zeta$ ) de las nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ●), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL, ■), y magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ , ▲) en función de la concentración de  $\text{KNO}_3$ , a pH 6.

Con toda esta información podemos argumentar el mecanismo por el que la matriz de PCL se deposita sobre los núcleos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y los engloba. Pensamos que ocurre una interacción electrostática netamente atractiva entre las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con carga eléctrica positiva y el polímero con carga eléctrica negativa. Recuérdese que las condiciones ligeramente ácidas en las que se formulan los nanocompuestos (pH 6) determinan estas cargas eléctricas superficiales (Figura 5). Gracias a esta interacción atractiva, el polímero se concentra sobre la superficie de la magnetita. Hecho que favorece la inclusión de los núcleos superparamagnéticos en el interior de la matriz polimérica y, por lo tanto, la formación de las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ .

La electroforesis se utilizó también para caracterizar la velocidad a la que se produce la degradación de la matriz de PCL, proceso que deja libre las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . El interés de este estudio radica en que, asumiendo que la



liberación del fármaco podría ocurrir al degradarse la matriz polimérica que lo contiene, mediante esta técnica podríamos acceder a una evaluación preliminar de la cinética de este proceso. En la Figura 7 se aprecia cómo los valores de  $u_e$  de la magnetita permanecen constantes durante todo el período del estudio ( $u_e \approx -3,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Estos valores negativos tan elevados pueden atribuirse a la formación sobre su superficie de una fina capa de oxidación (maghemita, un estado más oxidado de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (26). De hecho, los valores de  $u_e$  de nanopartículas de maghemita de igual tamaño a la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (bajo las mismas condiciones experimentales) son muy similares ( $u_e \approx -3,6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Esta Figura muestra cómo los valores de  $u_e$  de nanocompuestos se aproximan progresivamente a los característicos de los núcleos magnéticos. En concreto, se hacen iguales tras 15 días. Por lo tanto, podría decirse que la superficie de los núcleos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de los nanocompuestos queda cada vez más expuesta al medio de dispersión (de ahí los valores cada vez más negativos de  $u_e$ ), al producirse la degradación progresiva del recubrimiento polimérico. Así, cuando la cubierta de PCL se pierde completamente, ambos valores de  $u_e$  se hacen indistinguibles. La velocidad de degradación del polímero (y por lo tanto de liberación del principio activo vehiculizado, ver Figura 15) es lenta, lo que ha sido asociado al alto grado de cristalinidad y a la gran hidrofobia de la PCL (23, 27).

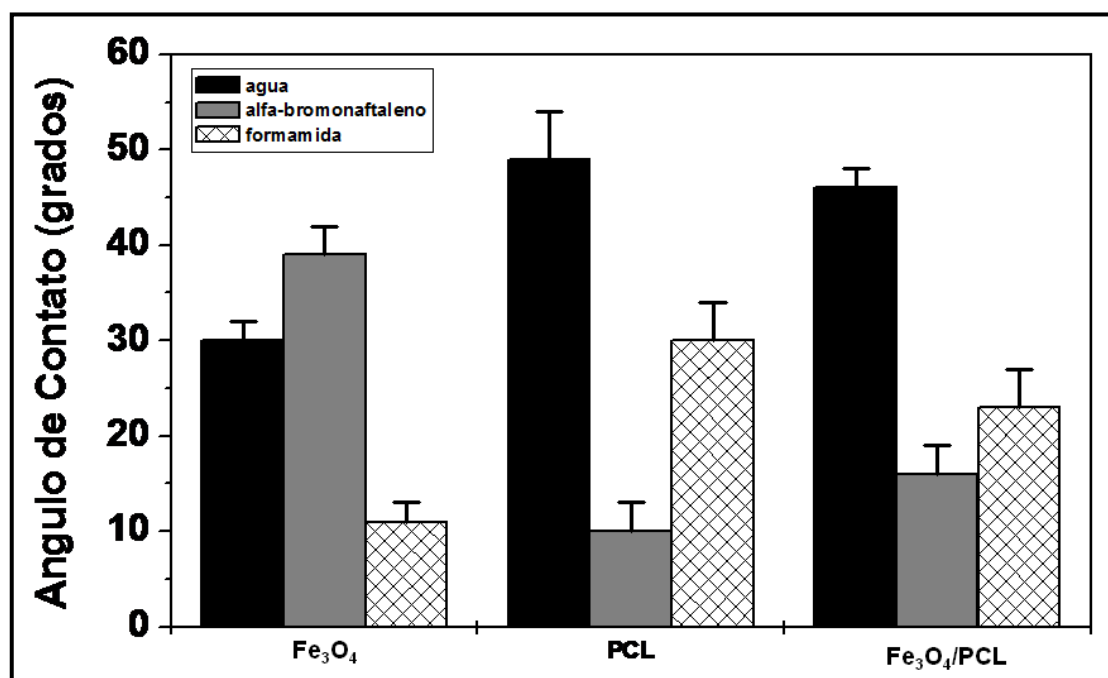


**Figura 7.-** Movilidad electroforética ( $u_e$ ) de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (USPIO, ■) y de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  (USPIO/PCL, □) en función del tiempo, a  $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$ , y a  $37,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



### 3.4. Termodinámica superficial

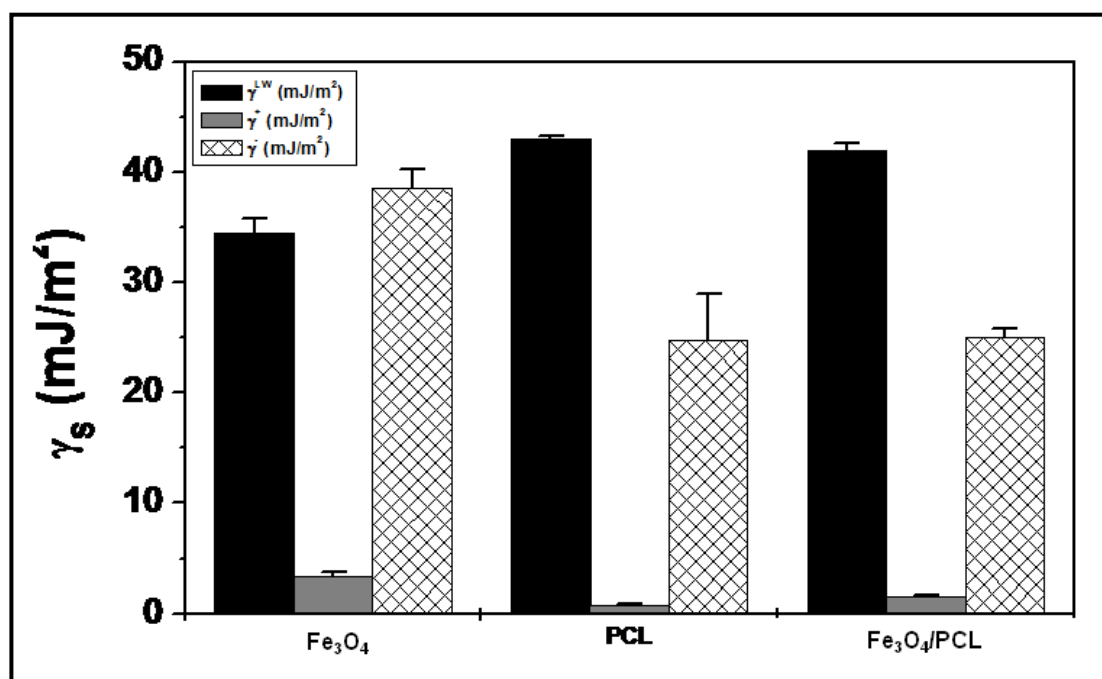
La Figura 8 recopila los valores promedio de los ángulos de contacto obtenidos tras realizar 16 determinaciones en las muestras de nanopartículas, midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Los resultados obtenidos destacan la existencia de importantes diferencias entre los núcleos de óxido de hierro y las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ .



**Figura 8.-** Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones con nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) y magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ ).

Sin embargo, la obtención de una información física veraz sobre la termodinámica de los tres tipos de nanomateriales hace precisa la evaluación de las componentes de la energía libre superficial ( $\gamma_s$ ) de cada uno de ellos. Los datos representados en la Figura 9 confirman las estimaciones basadas en la experiencia de electroforesis sobre la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos. En particular, para cualquier componente de la energía libre superficial considerado, sus valores para las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  coinciden casi totalmente con los del polímero puro. Además, a pesar de que la componente Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_s^{\text{LW}}$ ) es la menos afectada por el tratamiento superficial, como suele ser habitual (15, 29). Su valor para los nanocompuestos es casi el mismo que para el polímero. A pesar de que la componente electrón-aceptor ( $\gamma_s^+$ ) es muy pequeña para los tres tipos de nanomateriales, su magnitud para las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  es

virtualmente cero e idéntica a la de la PCL. La contribución electrón-donante ( $\gamma_s^-$ ) muestra una diferencia mucho más notable entre los núcleos de óxido de hierro y los nanocompuestos. El elevado valor de esta última componente en el caso de la magnetita confirma su carácter monopolar electrón-donante. Según van Oss (18), esto quiere decir que la magnetita puede tener interacciones ácido-base con fases de cualquier polaridad ( $\gamma^+$ ,  $\gamma^-$ , o ambas, diferentes de cero) pero las fuerzas AB no contribuyen a su energía libre de cohesión. A la vista de estos resultados, (junto con el análisis electrocinético de los nanomateriales), podemos afirmar que el recubrimiento de los núcleos magnéticos es completo bajo las condiciones de síntesis propuestas.



**Figura 9.-** Componentes de la energía libre superficial (mJ/m<sup>2</sup>) de las nanopartículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), poli(ε-caprolactona) (PCL) y magnetita/poli(ε-caprolactona) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL).

Finalmente, la utilización del modelo de van Oss permite relacionar los valores de energía libre superficial de las nanopartículas con su carácter hidrófobo/hidrófilo (18). En concreto si la variación de la energía libre superficial ( $\Delta G_{121}$ ) de los nanomateriales resulta ser negativa, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las nanopartículas, y se consideran hidrófobas. Por el contrario, la hidrofilia se corresponde con valores positivos de  $\Delta G_{121}$ . La Figura 10, muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de nanomateriales. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde al ser recubierta por el polímero hidrófobo, lo que puede considerarse como un indicio

muy claro de la eficacia de la metodología desarrollada de síntesis de nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL.

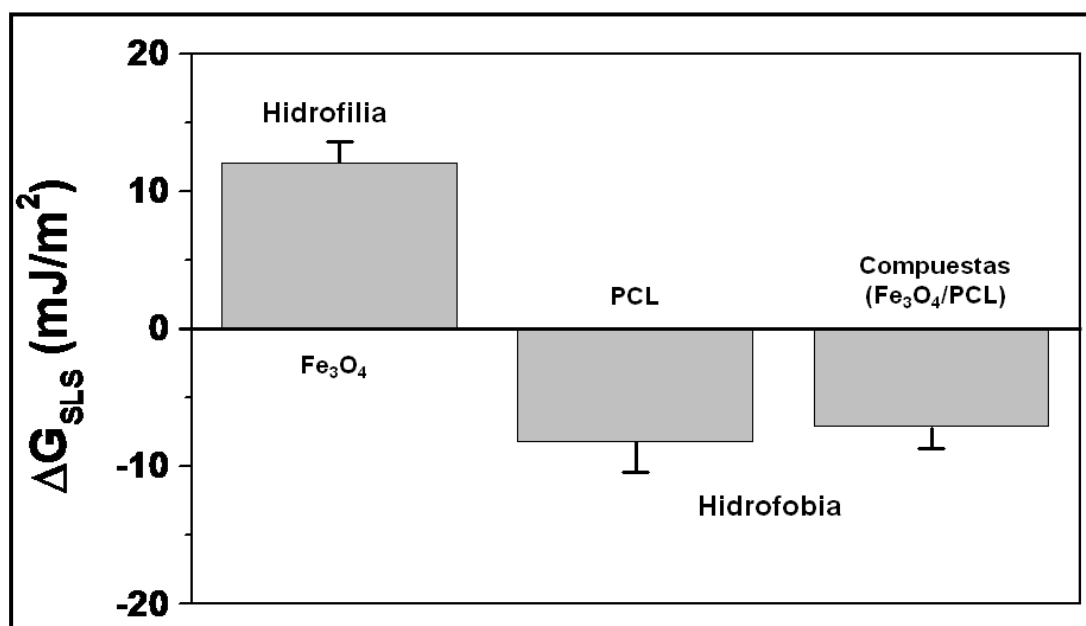
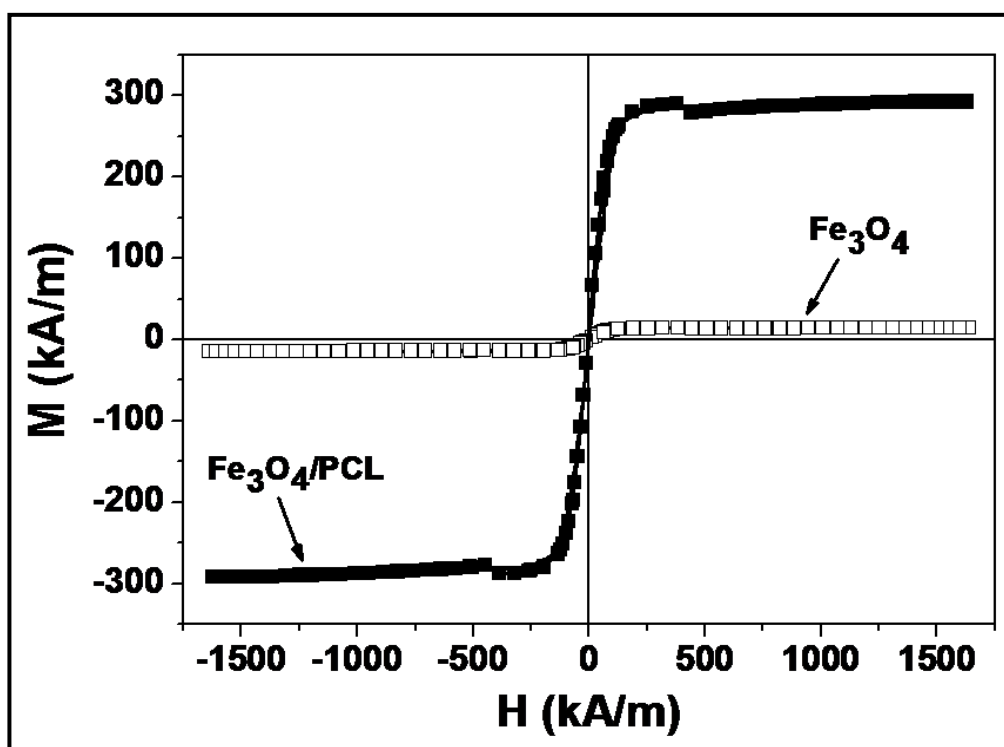


Figura 10.- Valores de  $\Delta G_{121}$  (mJ/m<sup>2</sup>) y carácter hidrófilo/hidrófobo de las nanopartículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), poli(ε-caprolactona) (PCL) y magnetita/poli(ε-caprolactona) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL).

### 3.5. Propiedades magnéticas

La Figura 11 recoge el ciclo de histéresis de las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL. En el caso de los núcleos de magnetita, como era de esperar (por su tamaño) no se observa histéresis por el carácter superparamagnético de éstos (21). De la región lineal del ciclo de histéresis (zona de campo magnético bajo) puede estimarse la susceptibilidad magnética inicial ( $\chi_i$ ) de los nanocompuestos:  $3,13 \pm 0,17$ ; y, el valor de la magnetización de saturación  $258 \pm 7$  emu/g. Estas excelentes propiedades magnéticas de las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL nos hacen pensar que el sistema coloidal diseñado tiene las características adecuadas para su utilización en el transporte de fármacos: un recubrimiento polimérico que permitirá la incorporación de cantidades adecuadas de fármaco y su liberación a una velocidad controlable, junto con una más que adecuada capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados. Esta última propiedad debe mejorar notablemente la concentración de los nanocompuestos en el lugar de acción y, de esta manera, la completa acumulación de la dosis de fármaco en esta región. Bajo estas condiciones debe potenciarse el efecto farmacológico del principio activo vehiculizado, al igual que además debe minimizarse la toxicidad asociada a una extensa biodistribución.

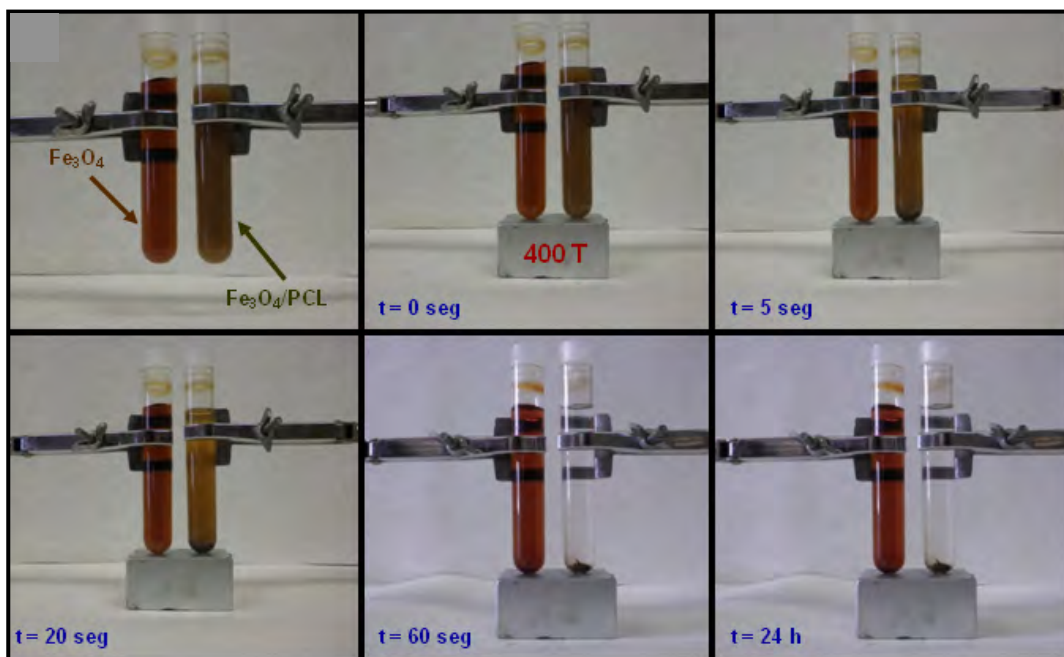


**Figura 11.-** Ciclo de histéresis de la nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\square$ ) y de magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ ,  $\blacksquare$ ).

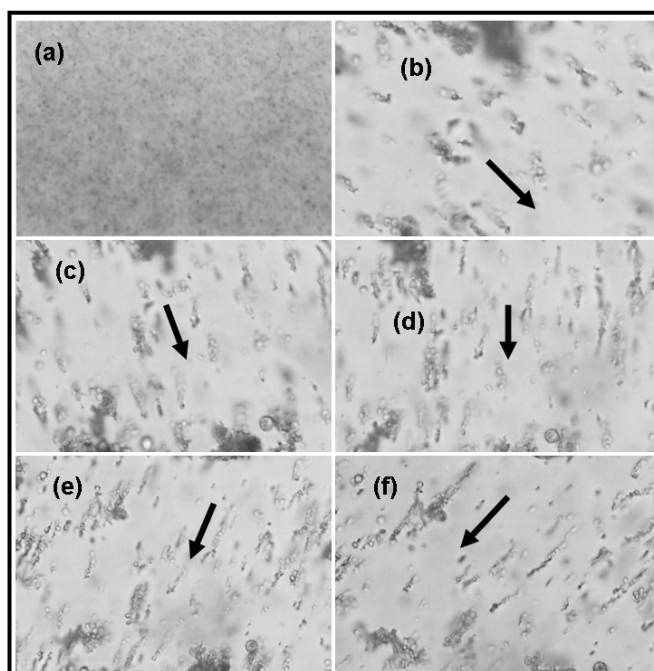
La capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  se estudió también de forma cualitativa mediante la visualización del efecto que ejerce un imán permanente de 400 mT sobre una suspensión de nanopartículas. Las fotos recogidas en la Figura 12 muestran cómo los nanocompuestos son atraídos muy rápidamente por el imán, quedando el sobrenadante completamente transparente en menos de 1 minuto. Por el contrario, la suspensión de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mantiene su aspecto homogéneo incluso tras 24 horas de exposición al gradiente magnético. El carácter superparamagnético de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  justifica la ausencia de respuesta magnética (21).

Con el fin de analizar el comportamiento microscópico de las suspensiones de nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ , realizamos un seguimiento mediante microscopía óptica de éstas. Como puede apreciarse en la Figura 13a, la suspensión de nanocompuestos es muy homogénea en ausencia del gradiente magnético. Sin embargo, cuando la gota de suspensión queda bajo la influencia del imán permanente de 400 mT, las nanopartículas tienden a formar agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección del gradiente magnético (Figura 13b en adelante). Este comportamiento puede explicarse si tenemos en cuenta la mayor

importancia de las interacciones magnéticas en comparación con las interacciones coloidales de tipo DLVO (principalmente, interacciones electrostáticas tipo van der Waals y de hidratación o ácido-base) que se producen entre los nanocompuestos.



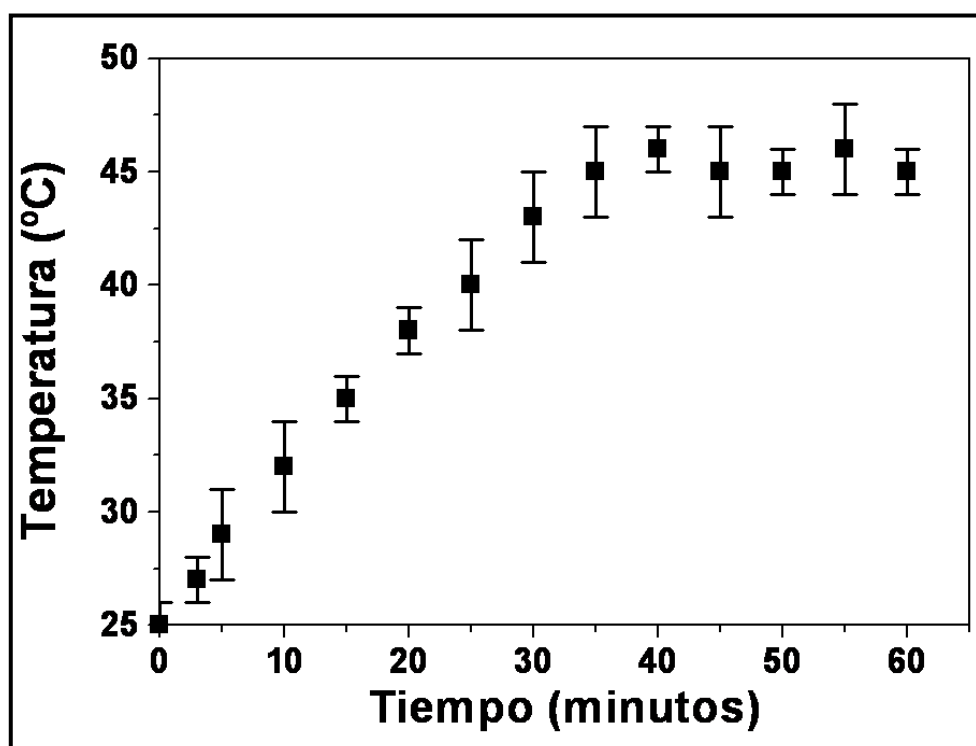
**Figura 12.-** Observación visual de la decantación magnética de las nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y de magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ ) bajo la influencia de un imán permanente de 400 mT localizado debajo de las muestras.



**Figura 13.-** Microfotografía óptica (magnificación: 40X) de una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) en ausencia (a) o bajo la influencia (b, c, d, e, f) de un gradiente magnético externo de 400 mT (en la dirección de la flecha).

### 3.6. Efecto de hipertermia

La Figura 14 muestra el calentamiento in vitro en función del tiempo de una suspensión acuosa de nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ . Bajo la exposición a un gradiente electromagnético alterno de alta frecuencia, la oscilación de los momentos magnéticos de los nanocompuestos provoca que éstos generen calor, alcanzándose la temperatura mínima de hipertermia ( $\approx 41^\circ\text{C}$ ) tras 25 minutos. La suspensión alcanza una temperatura máxima de  $45^\circ\text{C}$  tras 35 minutos. Este efecto de hipertermia es consecuencia de una pérdida de histéresis magnética por parte de las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  (7, 9). Como puede apreciarse en la Figura, la temperatura se mantiene estable hasta la finalización del experimento, circunstancia especialmente interesante ya que el calentamiento a esta temperatura de las células tumorales durante 30 minutos, les provoca daños irreversibles e induce su muerte (30). Este fenómeno demuestra el buen control sobre la temperatura y el flujo de calor que ofrecen los nanocompuestos, un requisito básico para su aplicación en hipertermia. Debe considerarse además que si la temperatura hubiera seguido aumentando sin control ( $>48^\circ\text{C}$ ), los tejidos sanos que rodean la masa tumoral se quemarían y morirían (31). Este efecto también ha sido relacionado con la activación específica de la liberación de fármacos en el intersticio tumoral (32) y con el aumento de la permeabilidad de las membranas biológicas a las nanopartículas (33).



**Figura 14.-** Curva de calentamiento de una suspensión de nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  (10 mg/mL) bajo la acción de un gradiente electromagnético alterno (frecuencia e intensidad: 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente).

### 3.7. Compatibilidad sanguínea

La Tabla 1 recoge los resultados del test de compatibilidad sanguínea de las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL. El análisis de estos datos en comparación con los obtenidos para la muestra control, nos revela cómo los nanocompuestos presentan un efecto despreciable sobre los procesos de hemólisis, activación del complemento y generación de selectina P. De esta forma, el test sugiere que las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL presentan un margen de seguridad in vivo amplio y adecuado para la vía de administración intravenosa (19).

**Tabla 1.-** Compatibilidad sanguínea de las nanopartículas magnetita/poli(ε-caprolactona) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL) en términos de hemólisis (%), activación plaquetaria [generación de selectina P (ng/mL)] y activación del complemento [producción de C3a en la forma del péptido C3a-desArg (ng/mL)]. Los datos se expresan como valor medio ± desviación estándar (n = 5).

Muestra	Hemólisis (%)	Selectina P (ng/mL)	C3a-desArg (ng/mL)
<b>Nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL</b>	1,9 ± 0,1	77 ± 6	<b>296 ± 9</b>
<b>Control (solución PBS)</b>	<b>0</b>	<b>115 ± 4</b>	<b>281 ± 12</b>

### 3.8. Evaluación de la capacidad de vehiculización de doxorubicina

Los resultados obtenidos en el ensayo de incorporación de doxorubicina sobre la superficie de las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL se recogen en la Tabla 2. Si bien los valores obtenidos de adsorción pueden considerarse bajos, se observa un efecto positivo de la concentración molar de fármaco utilizada sobre este proceso.

**Tabla 2.-** Valores de entrapment efficiency (EE, %) y drug loading (DL, %) de la doxorubicina en las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL, mediante adsorción superficial y en función de la concentración molar de fármaco.

Doxorrubicina (M)	EE (%)	DL (%)
10 <sup>-5</sup>	8,93 ± 0,37	0,05 ± 0,01
10 <sup>-4</sup>	22,62 ± 0,21	0,13 ± 0,02
10 <sup>-3</sup>	29,36 ± 0,41	1,62 ± 0,11

Una vez caracterizada la escasa incorporación de la doxorubicina en la superficie de los nanocompuestos, nos centramos en el estudio de la contribución del, a priori, principal método de vectorización de fármacos: la incorporación del principio activo en el medio donde se generan las nanopartículas. En este estudio también analizamos el efecto que la concentración de fármaco ejerce sobre la vehiculización en matriz. La Tabla 3 recoge la cantidad de doxorubicina



incorporada en los nanocompuestos para diferentes concentraciones de fármaco utilizadas. Como puede apreciarse, la absorción de doxorubicina en la matriz de las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL aumenta con la concentración de ésta presente en el medio de síntesis. Los valores obtenidos de incorporación de fármaco son claramente superiores a los alcanzados mediante el procedimiento de adsorción superficial (a iguales concentraciones de principio activo; ver Tabla 2), lo que justifica la selección del método de vehiculización mediante absorción en matriz como el más adecuado para la formulación de nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL cargadas con doxorubicina.

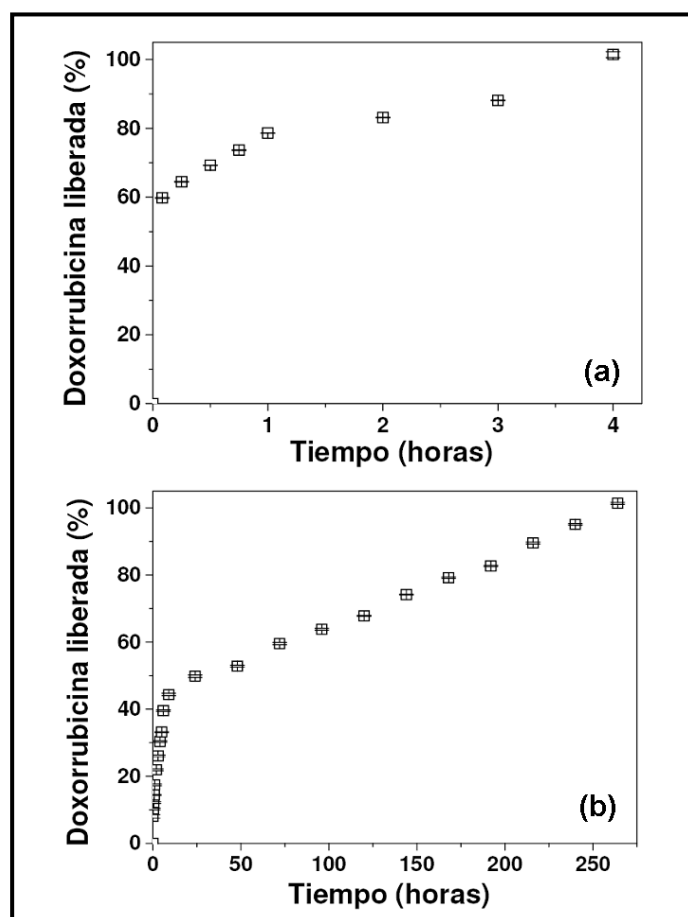
**Tabla 3.-** Valores de entrapment efficiency (EE, %) y drug loading (DL, %) de la doxorubicina en la las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL, mediante absorción y en función de la concentración molar de fármaco.

Doxorrubicina (M)	EE (%)	DL (%)
10 <sup>-5</sup>	9,24 ± 0,83	0,07 ± 0,01
10 <sup>-4</sup>	56,12 ± 1,08	0,52 ± 0,06
10 <sup>-3</sup>	62,34 ± 1,26	0,57 ± 0,08

Las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL, formuladas bajo las condiciones óptimas de vehiculización de doxorubicina (concentración de fármaco: 10<sup>-3</sup> M, tanto mediante adsorción como por absorción) se utilizaron en los ensayos in vitro de liberación. Los resultados de este ensayo se recogen en la Figura 15. Se observa cómo cuando se incorpora esta molécula exclusivamente en la superficie de las nanopartículas mediante adsorción, la liberación de la dosis vehiculizada ocurre en sólo 4 horas. Por el contrario, si la incorporación de doxorubicina se realiza mediante el método de absorción en matriz, el 17 % de la dosis vehiculizada se libera durante la primera hora, mientras que el 83 % restante mucho más progresivamente durante 11 días. Para completar el análisis de este proceso de liberación de doxorubicina, conviene recordar que la técnica de electroforesis nos permitió caracterizar cualitativamente un proceso de degradación de la matriz polimérica próximo a las dos semanas de duración (Figura 7), lo cual coincide con el tiempo total preciso para que todas las moléculas de doxorubicina se liberen de los nanocompuestos.

El proceso de liberación de doxorubicina es claramente bifásico cuando la dosis de principio activo se incorpora en las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PCL mediante el procedimiento de absorción en matriz. La liberación consta de una fase rápida que probablemente significa la pérdida del principio activo asociado a la superficie o débilmente atrapado (adsorbido en los poros superficiales). La liberación de doxorubicina más sostenida en el tiempo durante la segunda fase, podría deberse

a un proceso combinado de difusión del fármaco a través de la matriz polimérica y de degradación de esta matriz.



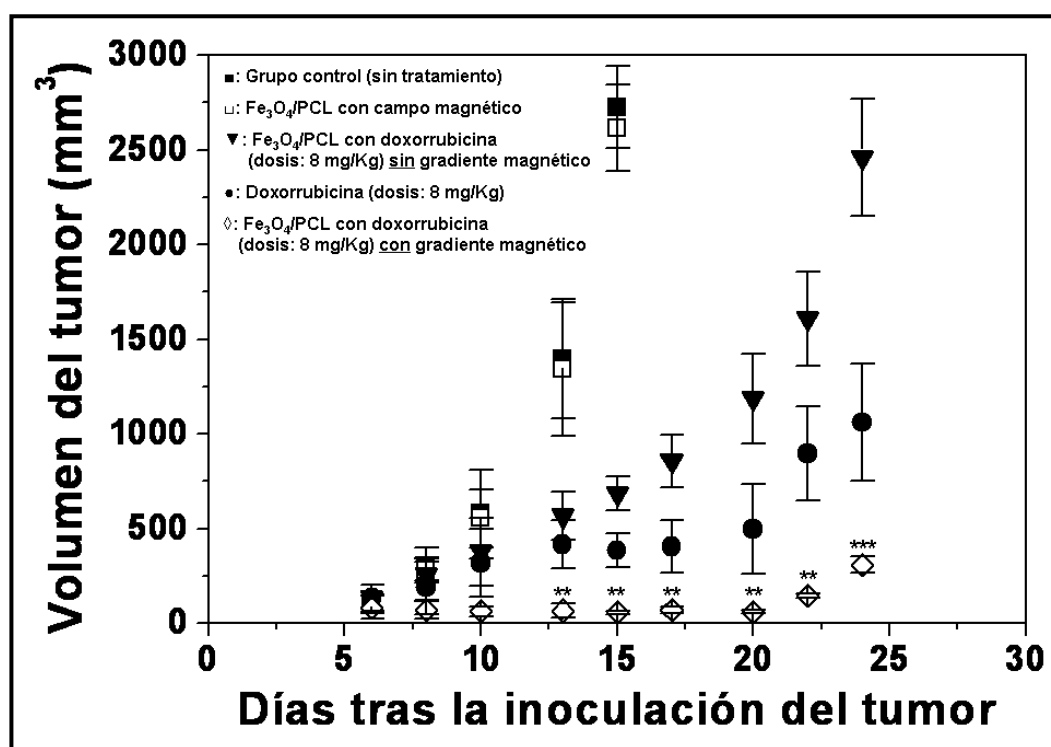
**Figura 15.-** Liberación de doxorubicina (%) adsorbida (a), y (b) absorbida desde las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  en función del tiempo de incubación en una solución tampón  $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$ ) a  $37,0 \pm 0,5$  °C.

### **3.9. Evaluación de la actividad antitumoral in vivo de las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) con doxorubicina vehiculizada**

Este estudio, pretende definir la actividad antitumoral de nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT. En concreto, en un modelo de ratones Balb/c con tumor subcutáneo inducido con células murinas EMT6 de cáncer de pulmón.

Como puede apreciarse en la Figura 16, no se obtuvo efecto antitumoral alguno en el grupo (placebo) de ratones tratado con nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  (sin fármaco unido) guiadas magnéticamente (misma dosis de nanopartículas y esquema de tratamiento). Se observa además una menor actividad antitumoral en

el grupo tratado con nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) pero sin ser guiadas magnéticamente, en comparación con el grupo tratado con una solución acuosa de doxorubicina (dosis: 8 mg/Kg). Sin embargo, la mayor eficacia antitumoral ( $p < 0,05$ ) se observa en el grupo de ratones tratado con nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT, en comparación con el resto de grupos de tratamiento. Creemos que estos interesantes resultados son consecuencia de una mayor acumulación de las nanopartículas (y, por lo tanto, de la dosis de fármaco) en el tejido tumoral, gracias al menor tamaño de éstas y a su elevada capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados.



**Figura 16.-** Actividad antitumoral in vivo (en ratones Balb/c con tumor subcutáneo inducido con células murinas EMT6 de cáncer de pulmón) de las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ ) con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT ( $\diamond$ ), en comparación con un grupo control (sin tratamiento,  $\blacksquare$ ), nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  (sin fármaco) guiadas mediante el imán permanente (grupo placebo, misma dosis de nanopartículas y esquema de tratamiento,  $\square$ ), nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$  con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) pero sin ser guiadas magnéticamente ( $\blacktriangledown$ ), y una solución acuosa de doxorubicina (dosis: 8 mg/Kg,  $\bullet$ ). Análisis estadístico realizado utilizando el test t de Student. Los valores marcados con \*\*  $p < 0,05$ , y \*\*\*  $p < 0,001$  se consideran estadísticamente significativos y muy significativos, respectivamente.

#### 4. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación pone de manifiesto que las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) constituyen una plataforma ideal para el transporte de doxorrubicina hasta la masa tumoral, proceso facilitado enormemente por su óptima capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados. La extensa caracterización fisicoquímica realizada ha permitido definir las condiciones óptimas de síntesis de estos nanocompuestos. Consideramos que el método de formulación es reproducible, sencillo y asequible económicamente. La capacidad de las nanopartículas magnetita/poli( $\epsilon$ -caprolactona) para la hipertermia, su compatibilidad sanguínea, y los excelentes resultados obtenidos en cuanto a mejora de la actividad antitumoral de doxorrubicina, nos hacen pensar que esta nanoplataforma podría ser utilizada en el diseño de una terapia combinada (quimioterapia optimizada + hipertermia) muy eficaz contra el cáncer.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación económica procedente del proyecto PE2008-FQM-3993 (Junta de Andalucía, España).

#### 6. REFERENCIAS

1. Couvreur, P., & Vauthier, C. (2006). Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research*, 23(7), 1417-1450.
2. Zhang, D. Y., Shen, X. Z., Wang, J. Y., Dong, L., Zheng, Y. L., & Wu, L. L. (2008). Preparation of chitosan-polyaspartic acid-5-fluorouracil nanoparticles and its anti-carcinoma effect on tumor growth in nude mice. *World Journal of Gastroenterology*, 14(22), 3554-3562.
3. Arias, J. L. (2011). Drug targeting strategies in cancer treatment: An overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(1), 1-17.
4. Davis, M. E., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 771-782.
5. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310-1316.
6. Durán, J. D. G., Arias, J. L., Gallardo, V., & Delgado, A. V. (2008). Magnetic colloids as drug vehicles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2948-2983.
7. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L. V., & Muller, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064-2110.
8. Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M. R., & Santamaría, J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2(3), 22-32.
9. Hergt, R., Dutz, S., Müller, R., & Zeisberger, M. (2006). Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(38), S2919-S2934.
10. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185-229.

11. Sun, J. B., Duan, J. H., Dai, S. L., Ren, J., Zhang, Y. D., Tian, J. S., & Li, Y. (2007). *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of doxorubicin loaded with bacterial magnetosomes (DBMs) on H22 cells: The magnetic bio-nanoparticles as drug carriers. *Cancer Letters*, 258(1), 109-117.
12. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. Ph., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1-R4.
13. Arias, J. L., López-Viota, M., Sáez-Fernández, E., & Ruiz, M. A. (2010). Formulation and physicochemical characterization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 204-208.
14. Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics*, 17(2), 1247-1248.
15. Arias, J. L., Gallardo, V., Gómez-Lopera, S. A., Plaza, R. C., & Delgado, A. V. (2001). Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *Journal of Controlled Release*, 77(3), 309-321.
16. Arias, J. L., Reddy, L. H., & Couvreur, P. (2009). Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *Journal of Drug Targeting*, 17(8), 586-598.
17. O'Brien, R. W., & White, L. R. (1978). Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 74, 1607-1624.
18. van Oss, C. J. (2006). *Interfacial forces in aqueous media* (2nd ed.) Boca Raton: CRC Press.
19. Dash, B. C., Réthoré, G., Monaghan, M., Fitzgerald, K., Gallagher, W., & Pandit, A. (2010). The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials*, 31(32), 8818-8197.
20. Arias, J. L., López-Viota, M., Sáez-Fernández, E., Ruiz, M. A., & Delgado, A. V. (2011). Engineering of an antitumor (core/shell) magnetic nanoformulation based on the chemotherapy agent ftorafur. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384(1-3), 157-163.
21. López-López, M. T., Durán, J. D. G., Delgado, A. V., & González-Caballero, F. (2005). Stability and magnetic characterization of oleate-covered magnetite ferrofluids in different nonpolar carriers. *Journal of Colloid Interface Science*, 291(1), 144-151.
22. Decuzzi, P., Pasqualini, R., Arap, W., & Ferrari, M. (2009). Intravascular delivery of particulate systems: Does geometry really matter? *Pharmaceutical Research*, 26(1), 235-243.
23. Sáez-Fernández, E., Ruiz, M. A., & Arias, J. L. Drug delivery systems base on poly( $\epsilon$ -caprolactone) for cancer treatment. *Ars Pharmaceutica*, 50(2), 83-96.
24. Lyon, R. J. P. (1967). Infrared absorption spectroscopy. En J. Zussman (Ed.), *Physical Methods in Determinative Mineralogy* (pp. 371-399). London: Academic Press.
25. Gartstein, E., Cohen, J. B., & Mason, T. O. (1986). Defect agglomeration in Wüstite at high temperatures—II. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 47(8), 775-781.
26. Plaza, R.C., Arias, J. L., Espín, M., Jiménez, M. L., & Delgado, A. V. (2002). Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *Journal of Colloid Interface Science*, 245(1), 86-90.
27. Sinha, V. R., Bansal, K., Kaumria, R., & Trehan, A. (2004). Poly-( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres and nanospheres: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), 1-23.
28. Lince, F., Marchisio, D. L., & Barresi, A. A. (2008). Strategies to control the particle size distribution of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid Interface Science*, 322(2), 505-515.
29. Plaza, R. C., Zurita, L., Durán, J. D. G., González-Caballero, F., & Delgado, A. V. (1998). Surface thermodynamics of Hematite/Yttrium Oxide core-shell colloidal particles. *Langmuir*, 14(24), 6850-6854.

30. Huber, D. L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, 1(5), 482-501.
31. Lao, L. L., & Ramanujan, R. V. (2004). Magnetic and hydrogel composite materials for hyperthermia applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(10), 1061-1064.
32. Purushotham, S., & Ramanujan, R. V. (2010). Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 6(2), 502-510.
33. Tashjian, J. A., Dewhurst, M. W., Needham, D., & Viglianti, B. L. (2008). Rationale for and measurement of liposomal drug delivery with hyperthermia using non-invasive imaging techniques. *International Journal*.

### **NOTA DEL EDITOR**

Este trabajo obtuvo el Premio del Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos de España en el concurso científico 2011 de la Real Academia Nacional de Farmacia.





## Estudio de Utilización de Dabigatrán Etxilato en Pacientes Hospitalizados

Isabel Cuesta López, Eva Delgado Silveira, Teresa Bermejo Vicedo, Juana Benedí González

Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid. Spain.

e-mail: [mariaisabel.cuesta@salud.madrid.org](mailto:mariaisabel.cuesta@salud.madrid.org)

### RESUMEN

Se ha definido el perfil de utilización de dabigatrán etexilato en pacientes hospitalizados, en un estudio de utilización de tipo prescripción-indicación, observacional, prospectivo, de cuatro meses de duración, realizado en un hospital general. Los datos se obtuvieron, a partir de los tratamientos farmacológicos del programa de prescripción electrónica, las analíticas y la historia clínica de los pacientes. Se revisó la adaptación a la ficha técnica del medicamento y al protocolo de utilización del hospital, teniendo en cuenta que la prescripción está restringida a los Servicios de Traumatología y Geriátrica para la prevención primaria de episodios tromboembólicos tras cirugía programada de reemplazo total de cadera o rodilla. Se registró la incidencia de reacciones adversas al medicamento. Se utilizaron 138 pacientes, que iniciaron el tratamiento con dabigatrán etexilato, de los cuales el 97,10% ingresó en el servicio de Traumatología. En un 89,13% de los pacientes, se prescribió el dabigatrán para la indicación aprobada en ficha técnica, mientras que en un 10,87%, se utilizó para otras indicaciones. El 57,24% de las prescripciones, se adaptaron al protocolo del hospital y a la ficha técnica. La reacción adversa más frecuente fue manchado en el lugar de la herida (7,97%). La utilización de dabigatrán ha sido la adecuada para la mayoría de los pacientes.

**Palabras clave:** Dabigatrán etexilato; Estudio de utilización; Tromboembolismo venoso; Paciente quirúrgico; Profilaxis.

## **ABSTRACT**

### *Utilization Study of Dabigatran Etexilate in Hospitalized Patients*

The dabigatran etexilate therapy will help to define its safety profile in hospitalized patients. A four-month prospective, observational, prescription-indication utilization study. Data were obtained through review of drug therapy in electronic prescription, laboratory parameters and medical history. The recommendations of product information and hospital protocol were reviewed and it was considered that dabigatran is a restricted drug in the hospital for primary prevention of venous thromboembolic events in adult patients who have undergone elective total hip or total knee replacement surgery. The incidence of adverse drug events was recorded. 138 patients started treatment with dabigatran etexilate; 97,10% were admitted in the traumatology hospitalisation unit. In most patients (89,13%), dabigatran was prescribed for the authorized indication but it was also used for other indications (10,87%). A 57,24% of prescriptions were adapted to the recommendations. The most commonly reported adverse event was bleeding in surgical wound (7,97%). Use of dabigatran etexilate was adequate for most patients.

**Keywords:** Utilization study; Dabigatran etexilate; Venous thromboembolism; Surgical patient; Prophylaxis.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La investigación sobre la eficacia de los medicamentos a través de los ensayos clínicos, ha aumentado mucho en los últimos años. Sin embargo, las condiciones en las que se desarrollan los ensayos clínicos no corresponden exactamente con la práctica habitual (1). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los estudios de utilización de medicamentos (EUM) son los que tienen como objetivo de análisis: “la comercialización, distribución, prescripción y uso de medicamentos en una sociedad, con acento especial sobre las consecuencias médicas, sociales y económicas resultantes” (2). Permiten identificar cuáles son los patrones de oferta, prescripción, dispensación, consumo, cumplimiento terapéutico y cualquier otro aspecto relacionado con los medicamentos en una determinada población, con el objeto de conseguir su uso racional.

Pueden abarcar todas o algunas de las siguientes etapas (1):

- Descripción de la utilización de medicamentos.
- Análisis cualitativo de los datos obtenidos para identificar posibles problemas de inadecuación.
- Identificación de áreas de intervención en función del análisis anterior.
- Evaluación del impacto de las intervenciones sobre los problemas identificados.

Existen diferentes tipos de EUM:

- Estudios de la oferta de medicamentos.
- Estudios de consumo.
- Estudios cualitativos y auditorías terapéuticas.

Dentro de los estudios cualitativos, se encuentran los estudios de indicación-prescripción y de prescripción-indicación. Su objetivo es, no sólo describir el uso de los medicamentos en un ámbito determinado, sino también identificar los factores relacionados con dicho uso. Pueden estar dirigidos a aspectos concretos, como la evaluación del cumplimiento de la prescripción por parte de los pacientes, a la detección de errores de medicación o a la detección de problemas relacionados con la medicación en un contexto de atención farmacéutica.

En los primeros, se parte de una patología o indicación y se identifican las prescripciones asociadas a la misma (indicación-prescripción), mientras que en los segundos se parte de un fármaco o grupo de fármacos y se analizan las indicaciones para las que son utilizados (prescripción-indicación). A su vez, el diseño de este tipo de estudios puede ser: retrospectivo, transversal o de prevalencia o prospectivo.

Tras muchos años conviviendo con fármacos anticoagulantes limitados, la investigación farmacológica ha conseguido aportar nuevas moléculas, que potencialmente mejoran cualitativa y cuantitativamente las propiedades de sus antecesoras. Se han investigado nuevos anticoagulantes orales que actúan mediante diferentes mecanismos de acción y que tendrán que demostrar que son más eficaces y seguros que los tradicionales (3,4).

El anticoagulante ideal, debería tener un amplio margen terapéutico y una farmacocinética y farmacodinamia predecible, sin necesidad de monitorización. El fármaco tendría que estar disponible tanto por vía oral como por la parenteral y su inicio de acción tendría que ser rápido; así como sería deseable que su acción fuera reversible rápidamente, con o sin antídoto. No debe presentar importantes efectos adversos, ni interaccionar con otros medicamentos o alimentos. Es preferible también, que no exista la necesidad de realizar ajustes posológicos en pacientes con enfermedad renal o hepática y que su precio sea razonable (3).

El Ximelagatrán fue el primer inhibidor directo de la trombina con eficacia probada en comparación con warfarina comercializado, pero fue retirado del mercado en febrero de 2006 por producir un aumento significativo del riesgo de toxicidad hepática, especialmente con un uso prolongado.

El Dabigatrán etexilato es un nuevo inhibidor directo de la trombina disponible por vía oral, que recientemente ha demostrado ser eficaz sin compartir

la hepatotoxicidad con ximelagatrán (5). Se absorbe en el estómago y en el intestino delgado, y mediante una reacción de hidrólisis catalizada por una esterasa, se convierte en el metabolito activo, el dabigatrán.

Se comporta como un inhibidor potente, competitivo y reversible de la trombina humana, así como de la agregación plaquetaria inducida por trombina. Se une exclusivamente al sitio activo de la trombina, causando su inactivación. La inhibición de la trombina es dependiente de la concentración y se produce tanto en la trombina unida a fibrina como en la trombina libre.

La elevada selectividad de dabigatrán por trombina y su unión reversible, le confieren un perfil más seguro y predecible que el de las hirudinas (inhibidores directos de trombina de administración parenteral), que presentan unión irreversible (5,6).

La mayoría de los pacientes hospitalizados presentan al menos un factor de riesgo para el desarrollo de tromboembolismo venoso (TEV) y aproximadamente el 40% presenta tres o más (7).

En pacientes quirúrgicos existen numerosos factores de riesgo para el desarrollo de TEV, trombosis venosa profunda (TVP) y embolismo pulmonar (TEP), incluyendo tipo y extensión de la cirugía, duración de la estancia hospitalaria, antecedentes de TEV o cáncer, inmovilización, episodios recientes de sepsis, presencia de acceso venoso central, embarazo o periodo postparto y estados de hipercoagulabilidad heredados o adquiridos (5,7).

El TEV es extraordinariamente prevalente en la especialidad de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Según la Conferencia de Consenso del American College of Chest Physicians, publicada en 2001, determinadas técnicas quirúrgicas, tanto electivas como traumáticas, sobre la extremidad inferior constituyen un importante factor de riesgo (8).

Sin profilaxis, la prevalencia de TVP demostrada por flebografía después de prótesis total de cadera (PTC), prótesis total de rodilla (PTR) o fractura del tercio superior del fémur es del orden del 50-60%, con un 25% de TVP proximal y un 7-11% de embolismo pulmonar asintomático.

La incidencia de tromboembolismo sintomático es mucho menor. Estudios recientes demuestran que sólo del 1,3 al 3% de los pacientes intervenidos desarrollan una TVP sintomática en los tres primeros meses del postoperatorio (9).

Como resultado, la terapia anticoagulante se ha convertido en un estándar fundamental en la práctica clínica para la prevención del TEV en pacientes sometidos a cirugía ortopédica mayor (5,7,9,10).

El objetivo principal de este trabajo es el de definir el perfil de utilización de dabigatrán etexilato en pacientes hospitalizados y como objetivos secundarios: Cuantificar su uso en indicaciones no aprobadas en ficha técnica en el periodo de estudio; Determinar el grado de adaptación al protocolo de utilización disponible en el hospital y la incidencia de efectos adversos.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio de utilización de tipo prescripción-indicación de dabigatrán etexilato de carácter observacional y prospectivo, incluyendo los datos de todos los pacientes hospitalizados que iniciaron tratamiento durante su estancia en el Hospital Ramón y Cajal. El periodo de estudio fue de cuatro meses (1 de diciembre de 2010 a 31 de marzo de 2011).

Diariamente, se identificó a los pacientes que iniciaban, continuaban o finalizaban tratamiento con dabigatrán etexilato mediante las prescripciones realizadas en el programa de prescripción electrónica asistida (Prescriwin®).

La recogida de datos se realizó mediante la revisión del tratamiento farmacológico registrado en Prescriwin®, las analíticas, los informes evolutivos de enfermería y médicos recogidos en la historia clínica, los informes médicos de ingresos previos, y de urgencias de la base de datos "Cajal" e informes al alta.

Para cada paciente se recogieron las siguientes variables: edad, sexo, GFH, servicio prescriptor, comorbilidades, diagnóstico, tipo de cirugía y fecha de la misma, indicación de dabigatrán etexilato, dosis, pauta, duración del tratamiento, existencia o no de terapia previa con el fármaco, continuación o no del tratamiento al alta hospitalaria, interacciones y contraindicaciones. Se recogieron también valores de los siguientes parámetros analíticos: creatinina, hemoglobina, razón normalizada internacional (INR) y alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).

La información se registró en una hoja de recogida de datos para cada paciente (Anexo I). Se creó una base de datos utilizando Microsoft Excel 2007.

La dosis estándar recomendada en pacientes adultos es de 220 mg al día, iniciando con la mitad de la dosis entre 1 y 4 horas después de la intervención, durante 10 días en prótesis de rodilla o 28-35 días en prótesis de cadera (11).

La dosis recomendada en pacientes mayores de 75 años, con insuficiencia renal moderada o tratamiento concomitante con amiodarona es 150 mg al día. Está contraindicado el tratamiento en pacientes con insuficiencia renal o hepática grave, en casos de hemorragia clínicamente significativa y en pacientes en tratamiento con quinidina (11).

El protocolo de utilización de dabigatrán disponible en el hospital recoge las mismas recomendaciones de uso que la ficha técnica, exceptuando la posibilidad de modificar la duración del tratamiento tras cirugía de reemplazo total de rodilla, que a criterio del médico puede extenderse a 4-6 semanas (7,9).

Se tuvo en cuenta el hecho de que los pacientes continuaran con el tratamiento tras recibir el alta para completar la duración mínima recomendada (10 días en cirugía de rodilla y 28-35 en cirugía de cadera).

Desde que la Comisión de Farmacia y Terapéutica aprobó la inclusión de dabigatrán etexilato en la Guía Farmacoterapéutica del Hospital Ramón y Cajal en diciembre de 2009, se ha considerado un fármaco de prescripción restringida a los Servicios de Traumatología y Geriátrica para la prevención primaria de episodios tromboembólicos tras cirugía programada de reemplazo total de cadera o rodilla.

Cuando la prescripción no se ajustaba a lo recomendado en ficha técnica y/o protocolo, bien por indicación, dosis, contraindicación, etc., el farmacéutico contactaba con el médico prescriptor.

Las variables cualitativas se analizaron descriptivamente mediante frecuencias y las cuantitativas con medidas de tendencia central y de dispersión (media, mediana, desviación estándar).

Se solicitó la autorización del Comité de Investigación y Ensayos Clínicos (CEIC).

El tratamiento de los datos se realizó conforme a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Población de estudio**

El número de pacientes que inició tratamiento con dabigatrán etexilato durante el periodo de estudio fue de 138, de los cuales el 78,99% (109) fueron mujeres. La media de edad fue  $70,88 \pm 9,82$ .

El 97,10% de los pacientes ingresó a cargo del Servicio de Traumatología. El 2,9% restante se repartió entre los Servicios de Geriátrica, Neurología y Cirugía Vascular.

El 6,52% habían recibido previamente al ingreso tratamiento con dabigatrán: debido a cirugía previa 77,77% y el 22,23% para otras indicaciones.

### 3.2. Valoración de la utilización de dabigatrán para la indicación aprobada en ficha técnica

Al 89,13% de los pacientes se les prescribió dabigatrán etexilato para la indicación aprobada en ficha técnica, de éstos, el 73,98% de pacientes fueron sometidos a una cirugía programada de reemplazo total de rodilla y el 26,02% de cadera.

La duración del tratamiento se ajustó a las recomendaciones establecidas en ficha técnica en el 82,42% y 78,13% de los casos respectivamente.

La dosis y pauta fueron correctas en el 92,31% de los casos en los que dabigatrán fue utilizado en pacientes sometidos a cirugía de rodilla, y en el 81,25% de los pacientes sometidos a cirugía de cadera. En ambos grupos, el motivo más frecuente de pauta incorrecta fue que la dosis no se había ajustado siguiendo las recomendaciones en pacientes mayores de 75 años.

En las Tablas 1 y 2 se muestra un resumen de la duración del tratamiento y de las pautas empleadas.

**Tabla 1.-** Distribución de pacientes según tipo de cirugía y duración del tratamiento.

Tipo de cirugía	Duración tratamiento	n (%)
PTR	<10 días sin tratamiento al alta	5 (5,49%)
	<10 días más tratamiento al alta	75 (82,42%)
	>10 días	11 (12,09%)
PTC	<35 días sin tratamiento al alta	7 (21,87%)
	<35 días con tratamiento al alta	25 (78,13%)
	>35 días	0

**Tabla 2.-** Distribución de pacientes según tipo de cirugía y pauta.

Tipo de cirugía	Pauta	n (%)
PTR	150 mg/día	29 (31,87%)
	220 mg/día	55 (60,44%)
	Dosis incorrecta	7 (7,69%)
PTC	150 mg/día	7 (21,87%)
	220 mg/día	19 (59,38%)
	Dosis incorrecta	6 (18,75%)

PTR: prótesis total de rodilla; PTC: prótesis total de cadera



### 3.3. Valoración de la utilización de dabigatrán para otras indicaciones

En el 10, 87% de los pacientes, el dabigatrán fue utilizado fuera de las indicaciones recogidas en ficha técnica durante el periodo de estudio (Tabla 3). De los pacientes en los que se utilizó dabigatrán para otra cirugía de cadera que no fuera el reemplazo total, el diagnóstico más frecuente fue la fractura de cadera.

**Tabla 3.-** Distribución de pacientes para las indicaciones no recogidas en ficha técnica.

Indicación	N
Otras cirugías de rodilla	1
Otras cirugías de cadera	9
Ictus	2
Fibrilación auricular (FA) crónica	3*
Embolia iliaca	1

\*Uno de los pacientes está incluido también en el grupo de otras cirugías de cadera por haber sido tratado con dabigatrán tras fractura de cadera.

Las pautas utilizadas en estos pacientes se resumen en la Tabla 4. La pauta de 110 mg cada 24 h se corresponde con una pauta errónea consecuencia de no actualizar la dosis en el programa de prescripción electrónica tras la administración de la primera dosis postcirugía.

**Tabla 4.-** Distribución de pacientes según la pauta utilizada en indicaciones no recogidas en ficha técnica.

Pauta	n
110 mg cada 12 h	4
150 mg cada 12 h	2
150 mg cada 24 h	3
220 mg cada 24 h	6
110 mg cada 24 h	1

El dabigatrán se utilizó siguiendo la pauta para fibrilación auricular (FA) en 6 pacientes. No se detectaron hemorragias ni otros efectos adversos que pudieran

estar relacionados con su administración, sólo un caso en el que la paciente fue dada de alta con dabigatrán y volvió a ingresar 48 h más tarde en el hospital con melenas, no obstante, la paciente fue diagnosticada posteriormente de cáncer de colon. Sin embargo, los resultados obtenidos no son concluyentes, puesto que el número de pacientes es muy pequeño y la duración media de la estancia hospitalaria para ellos fue de 4 días.

### ***3.4. Adaptación a las recomendaciones del protocolo y la ficha técnica***

La única diferencia entre las recomendaciones recogidas en el protocolo y la ficha técnica del medicamento es la posibilidad de prolongar la duración del tratamiento de los pacientes sometidos a cirugía de reemplazo total de rodilla que ofrece el protocolo.

Un 65,22% de las prescripciones se adaptaron al protocolo del hospital, mientras que un 57,24% se adaptaron tanto al protocolo como a la ficha técnica.

En el 7,98% de los pacientes la duración del tratamiento durante el periodo de ingreso se adaptó a lo indicado en el protocolo fuera de lo recoge la ficha técnica.

Los motivos más frecuentes en los que la prescripción no se ajustó a las recomendaciones fueron: prescripción para una indicación diferente, y duración del tratamiento menor a la recomendada durante el ingreso (sin datos para la continuación tras el alta hospitalaria, Tabla 5).

En el 7,25% de los pacientes no se disponía de los parámetros analíticos necesarios (aclaramiento de creatinina y/o ALT) para valorar si el inicio de tratamiento con dabigatrán estaba contraindicado.

De los pacientes que iniciaron tratamiento y de los que se disponía de analítica previa, sólo hubo un paciente en el que se mantuvo la prescripción con valores de ALT por encima de 2 veces el límite superior normal, y otro cuyo valor de ALT previo a la cirugía era superior a lo recomendado, pero que mostró valores normales de la enzima en una nueva analítica solicitada por su médico tras ser informado por el farmacéutico.

**Tabla 5.-** Motivos de no adaptación al protocolo de utilización/ficha técnica de dabigatrán.

MOTIVO DE NO ADAPTACIÓN AL PROTOCOLO/FICHA TÉCNICA	N
Otra indicación	15
Menor duración de tratamiento de la recomendada	13
Dosis incorrecta al alta	4
Sin datos de laboratorio	3
Dosis incorrecta al alta y sin datos de laboratorio disponibles	1
Tratamiento concomitante con enoxaparina	1
Menor duración de la recomendada y primera dosis incorrecta	1
Día de la intervención sin tratamiento anticoagulante	1
Primera dosis incorrecta	1
Primera dosis incorrecta, errónea al alta y sin datos de enzimas hepáticas	1
Reducción de dosis sin motivo aparente y duración menor durante el ingreso sin información al alta	1
Dosis incorrecta y sin datos de laboratorio disponibles	1
Valor elevado de ALT	1
Primera dosis mal administrada	1
Segunda dosis mal administrada	1
Infradosificación (110 mg/día en lugar de 220 mg/día)	1
Reducción de dosis sin motivo aparente	1

### 3.5. Efectos adversos

Las reacciones adversas detectadas durante el estudio se muestran en la Tabla 6.

Se suspendió dabigatrán por hemorragia en el lugar de la herida en un paciente. A otro paciente se le sustituyó dabigatrán por enoxaparina tras deterioro de la función renal secundario a diarrea.

El 15,94% de los pacientes necesitó transfusión de dos o más unidades de concentrados de hematíes durante el tratamiento con dabigatrán y un 24,64% recibió suplementos de hierro por vía oral.

**Tabla 6.-** Acontecimientos adversos.

Reacción adversa	n (%)
Manchado quirúrgico herida	11 (7,97)
Molestias estómago	6 (4,35)
Edema	5 (3,62)
Secreción de herida	4 (2,90)
Hematoma post-intervención	3 (2,17)
Diarrea	1 (0,72)
Hematuria	1 (0,72)
Complicación herida	1 (0,72)
Melenas	1 (0,72)

En el 5,80% hubo sospecha de TVP, que fue descartada en todos los casos mediante eco-doppler.

Un paciente que fue dado de alta para continuar tratamiento con dabigatrán 220 mg al día en su domicilio ingresó de nuevo en el hospital a las 48 h con diagnóstico de ictus isquémico. Tras el segundo ingreso fue dado de alta con enoxaparina 40 mg al día.

En un paciente se detectó la presencia de extrasístoles ventriculares y fue remitido a las consultas de cardiología para ser valorado.

### **3.6. Interacciones**

Ningún paciente presentó interacciones de relevancia clínica con otros medicamentos. En el 100 % de los casos hubo tratamiento concomitante con inhibidores de la bomba de protones.

#### **4. DISCUSIÓN**

La gran mayoría de los pacientes (97,10%) incluidos en nuestro estudio ingresaron a cargo del Servicio de Traumatología, que era uno de los servicios a los que se autorizó la prescripción del fármaco desde su inclusión en la Guía Farmacoterapéutica del hospital. De éstos, un elevado porcentaje (89,13%) recibieron tratamiento con dabigatrán para la indicación aprobada en ficha técnica. Los resultados obtenidos muestran que la restricción de prescripción por parte de la Comisión de Farmacia y Terapéutica ha servido para controlar la utilización de dabigatrán, y que en la mayoría de los casos la utilización se adapta a las recomendaciones.

Independientemente del tipo de cirugía, la pauta utilizada más frecuentemente fue 220 mg al día, lo que concuerda con la edad media de la población de estudio (70,88 años) y con las dosis ensayadas en los estudios pivotaes (RE-MODEL y RE-NOVATE) (12,13).

Creemos que los errores de dosificación encontrados pueden estar influenciados en parte, por la falta de seguimiento diario de los pacientes por parte de un mismo prescriptor, lo que en ocasiones conlleva la no actualización del tratamiento farmacológico.

En lo que respecta a la duración del tratamiento tras artroplastia total de rodilla, en el 94,51% de los pacientes sometidos a este tipo de cirugía fue superior a los 10 días indicados en ficha técnica (teniendo en cuenta los pacientes que debían continuar con el tratamiento en su domicilio). Sin embargo, se adapta a las recomendaciones de la Guía Clínica de la SECOT (Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología) (9) y la ACCP (American College of Chest Physicians) en su edición de 2008 (7), que indican que la duración será de entre 4 y 6 semanas.

Todos los anticoagulantes tienen asociado cierto riesgo de hemorragia, por ello, la seguridad de la anticoagulación es, probablemente, la preocupación más importante de los cirujanos ortopédicos, ya que una hemorragia en la articulación sustituida puede tener graves consecuencias para el resultado clínico (14).

La evaluación del potencial hemorrágico de los nuevos anticoagulantes, basada en los resultados de los ensayos clínicos, resulta importante a la hora de determinar su utilidad clínica. Pero los ensayos utilizan diversas definiciones para la evaluación del potencial hemorrágico, y estas variaciones en las definiciones deben tenerse en cuenta. En los estudios RE-MODEL y RE-NOVATE se siguieron los criterios de la International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (15).

En nuestro estudio, se detectó sangrado en el 7,97% de los pacientes, siendo este porcentaje inferior al aproximadamente 14% notificado en los ensayos pivotaes, donde la frecuencia de sangrados mayores (incluyendo sangrados en el lugar de la herida) fue menor al 2% (11). Creemos que la diferencia en la

frecuencia de sangrado puede deberse a pérdida de información al recogerse ésta de los evolutivos médicos y de enfermería, y no de forma directa.

El 15,94% de los pacientes necesitó transfusión de dos o más unidades de concentrados de hematíes, aunque no podemos confirmar que la necesidad de transfusión estuviera únicamente relacionada con la utilización de dabigatrán.

El 2,90% de los pacientes presentó secreción de heridas, en comparación con el aproximadamente 5% que se detectó en los ensayos RE-MODEL y RE-NOVATE. Creemos que esta diferencia también puede deberse entre otros motivos al método de recogida de la información y a que no era el objetivo del estudio evaluar la seguridad del fármaco. La presencia de hematuria (0,72%) también fue menor a la detectada en los ensayos (1,4%). El 2,17% de los pacientes presentó hematoma post-intervención, resultado semejante al encontrado en los ensayos pivotaes (aproximadamente 2%) (11).

La frecuencia de episodios hemorrágicos fue baja, pero aunque los datos de seguridad y de acontecimientos adversos son tranquilizadores, es necesario reunir series de datos más amplias antes de llegar a conclusiones definitivas.

El 100% de los pacientes mantuvo tratamiento concomitante con inhibidores de la bomba de protones. No sabemos si en estos pacientes la absorción de dabigatrán se vio disminuida, aunque los datos de la literatura muestran una disminución de la absorción de un 20-25% (6,16).

No se detectó ningún caso de TVP, fueron descartados todos aquellos casos en los que hubo sospecha.

No se registró un aumento de la incidencia de elevación de las enzimas hepáticas, si bien la ausencia de datos de laboratorio en el periodo postquirúrgico impidió hacer un seguimiento en la mayor parte de los pacientes.

Durante la realización de este estudio, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha ampliado las indicaciones de uso de dabigatrán (17). En el documento de la EMA, con fecha 14 de abril de 2011, se determina que esta ampliación de indicación se autoriza para dabigatrán 110 y 150 mg (18).

Sin embargo, existe una clara discrepancia con lo que la Food and Drug Administration (FDA) aprobó en octubre de 2010, ya que sólo aprobó la dosis más alta de dabigatrán (150 mg) para esta nueva indicación.

En nuestro estudio, sólo se incluyeron 6 pacientes en los que el dabigatrán se utilizó siguiendo la pauta para FA. Debido a que el número de pacientes es pequeño, los resultados obtenidos no nos permiten obtener conclusiones.

El ensayo RE-LY (19) se llevó a cabo en pacientes con FA con riesgo elevado de padecer ictus. En dicho estudio se analizó el fármaco (110 mg y 150 mg cada 12h) frente a warfarina en dosis ajustada según INR. El dabigatrán en dosis de 110 mg cada 12h causó menos sangrados que la warfarina, mientras que en dosis de 150 mg cada 12h no presentó diferencias. Sin embargo, el sangrado gastrointestinal fue más frecuente en este grupo (aproximadamente un 1% más en valor absoluto). El dabigatrán provocó con más frecuencia que la warfarina dispepsia y dolor abdominal (aproximadamente un 5% más en valores absolutos) y la incidencia de abandono del tratamiento fue superior en ambas dosis ensayadas (19-20%) respecto al grupo de la warfarina (15%). También se produjeron más infartos de miocardio (aproximadamente un 0,2% más por año).

## 5. CONCLUSIONES

1. La utilización de dabigatrán ha sido adecuada para la mayoría de los pacientes.
2. Sólo en el 10,87% se ha utilizado en indicaciones no recogidas en ficha técnica.
3. El 65,22% de las prescripciones se adaptaron a las recomendaciones recogidas en el protocolo de utilización en el hospital.
4. El 24,64% de los pacientes presentó efectos adversos, siendo el más frecuente la aparición de sangrado.

## 6. REFERENCIAS

1. Altimiras, J., Bautista, J., & Puigventós, F. (1992). Farmacoepidemiología y Estudios de Utilización de Medicamentos. En Bonal, J., Dominguez-Gil, A., Gamundi, M., Napal, V., & Valverde, E (Eds.). Farmacia Hospitalaria, Tomo I. Capítulo 2.9. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria.
2. Arnau, J. M., & Vallano, A. (2000). Estudio de Utilización de Medicamentos. Medicamentos y Salud, 2, 78-82.
3. Trujillo, T. C. (2010). Emerging anticoagulants for venous thromboembolism prevention. Am J Health-Syst Pharm, 67 (suppl 6), S17-25.
4. Ordovás, J. P. (2009). Dabigatran y rivaroxaban, nuevos anticoagulantes orales para el tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa. Farm Hosp, 33(3), 123-124.
5. Ma, T. K. W. (2011). Dabigatran etexilate versus warfarin as the oral anticoagulant of choice? A review of clinical data. Pharmacol Ther, 129(2), 185-194.
6. Ordovás, J. P., Climent, E., Jover A., & Valero I. (2009) Farmacocinética y farmacodinamia de los nuevos anticoagulantes orales. Farm Hosp, 33(3), 125-133.
7. Geerts, W. H., Berqvist, D., & Pineo, G. T. (2008). Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians. Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th ed). Chest, 133 (6 suppl), 381S-453S.
8. Geerts, W. H., Heit, J. A., Clagett, G. P., Pineo, C. F., Colwell, C. W., & Anderson, Jr F. A. (2001). Prevention of venous thromboembolism. Chest, 119, (1 Suppl), 132S-175S.



9. Granero, J. (2007). Guía de profilaxis tromboembólica en Cirugía Ortopédica y Traumatología. Grupo de Estudio del Tromboembolismo de la SECOT. Madrid.
10. Baser, O., Supina, D., Sengupta, N., Wang, L., Kwong, L. (2010). Impact of postoperative venous thromboembolism on Medicare recipients undergoing total hip replacement or total knee replacement surgery. *Am J Health-Syst Pharm*, 67, 1438-1445.
11. Ficha Técnica Pradaxa®. Medicamentos Autorizados en España (Uso humano). Web site: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000829/WC500041059.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf)
12. Eriksson B. I., Dahl, O. E., Rosencher, N., Kurth, A. A., Niek van Dijk, C., Frostick, S. P., Kalebo, P., Christiansen, A. V., Hantel, S., Hettiarachchi, R., Schnee, J., Buller, H. R., & RE-MODEL Study Group. (2007). Oral dabigatran etexilate vs. subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total knee replacement: the RE-MODEL randomized trial. *J Thromb Haemost*, 5, 2178–2185.
13. Eriksson, B. I., Dahl, O. E., Rosencher, N., Kurth, A. A., Niek van Dijk, C., Frostick, S. P. & RE-NOVATE Study Group. (2007). Dabigatran etexilate versus enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip replacement: a randomised, double-blind, non-inferiority trial (RENOVA-TE). *Lancet*, 370, 949–956.
14. Lotke, P. A., & Lonner, J. H. (2005). Deep venous thrombosis prophylaxis: better living through chemistry-in opposition. *J Arthroplasty*, 20, 15-17.
15. Schulman, S., & Kearon, C. (2005). Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. *J Thromb Haemost*, 3, 692-694.
16. Stangier, J., Rathgen, K., Stähle, H., Gansser, D., & Roth, W. (2007). The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 64, 292–303.
17. Informe mensual sobre medicamentos de Uso Humano y Productos Sanitarios. (abril 2011). Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Web site: <https://www.seguridadmedicamento.sanidadmadrid.org/home.aspx?accesoExterno=si&tipo=noticia&id=269>
18. CHMP Assessment Report for Pradaxa. European Medicines Agency (EMA). Ref: EMA/CHMP/304146/2011. Summary of opinion (post-authorisation) (April 2011) Web site: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion/human/000829/WC500105283.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion/human/000829/WC500105283.pdf)
19. Connolly, S., Ezekowitz, M. D., & Yusuf, S. (2009). Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 361, 1139-1151.

## NOTA DEL EDITOR

Este trabajo obtuvo el Premio CINFA en el concurso científico 2011 de la Real Academia Nacional de Farmacia.

**ANEXO I. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS**

<b>NºPACIENTE</b>	
<b>EDAD</b>	
<b>SEXO</b>	
<b>GFH/UE</b>	

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>TIPO DE CIRUGÍA</b>	

<b>FÁRMACO</b>	
<b>PREVIO (S/N)</b>	
<b>INDICACIÓN</b>	
<b>INDICACIÓN FUERA FT (S/N)</b>	
<b>PAUTA</b>	
<b>PAUTA AJUSTADA (S/N)</b>	
<b>MOTIVO AJUSTE</b>	
<b>DURACIÓN TRATAMIENTO</b>	
<b>DURACIÓN TRATAMIENTO FUERA FT (S/N)</b>	
<b>CONTRAINDICACIÓN (S/N)</b>	
<b>INTERACCIONES</b>	
<b>TRATAMIENTO AL ALTA CON DABIGATRAN</b>	

<b>OBSERVACIONES</b>	
----------------------	--

<b>SERVICIO PRESCRIPTOR</b>	
<b>INTERVENCIÓN FARMACÉUTICA (S/N)</b>	

<b>OTROS FÁRMACOS</b>					
<b>INDICACIÓN</b>					
<b>PAUTA</b>					

<b>PARÁMETROS ANALÍTICOS</b>	
<b>CREATININA</b>	
<b>INR</b>	
<b>ALT/AST</b>	
<b>Hb</b>	

### Endocannabinoides: Un nuevo Sistema de Comunicación en nuestro Organismo

Manuel Guzmán Pastor



Toma de posesión como académico correspondiente

Sesión celebrada el 7 de junio de 2012

e-mail: [edicion@ranf.com](mailto:edicion@ranf.com)

---

Excelentísima Señora Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excelentísimas Señoras y Señores Académicos, compañeros, familiares, amigos:

Es para mí un gran honor ingresar como Académico Correspondiente en la Real Academia Nacional de Farmacia, una de las más importantes Academias de nuestro país. Obviamente, mis primeras palabras no pueden ser más que de agradecimiento. Yo soy de los que piensan que uno en la vida es lo que es un tanto debido a sus actos y, al menos otro tanto, debido a sus circunstancias. En primer lugar, creo que es de justicia recordar que muy probablemente yo no estaría aquí si hubiera nacido en una “favela” de Río de Janeiro, en un poblado de Burkina Faso o en un “ghetto” de Lesotho. De igual manera, soy también plenamente consciente de que no estaría aquí sin la ayuda y el apoyo de muchas personas que han estado cerca de mí a lo largo de la vida. En primer lugar destacaría sin duda alguna a mis padres y hermanos, así como a mis amigos más cercanos, amigos entre los cuales incluyo tanto a los de fuera del ámbito de la Ciencia como a los de dentro de él. Puesto que estamos es un acto académico, me gustaría detenerme a mencionar a algunos de estos últimos. En orden cronológico, primero, la Profesora Carmen Acebal, de la Universidad Complutense, por ayudarme a descubrir el mundo de la Bioquímica, y después al que sin duda considero como mi principal mentor científico, el Profesor Math Geelen, de la Universidad de Utrecht; segundo, colegas complutenses como los Profesores Amador de Haro, José Antonio Ramos y Javier Fernández Ruiz, quienes, con su inestimable ayuda personal y logística, me posibilitaron constituir y hacer despegar un grupo de investigación propio; y, tercero y muy particularmente, a las personas que integran y han integrado dicho grupo de investigación, en el que tengo el enorme placer de poder trabajar. El progreso y sostenimiento del grupo se deben en gran parte a mis amigos y compañeros más *senior* del mismo, esto es, Guillermo Velasco, Ismael Galve y Cristina Sánchez. A ellos se han ido añadiendo sucesivamente otros muchos

miembros más jóvenes, de los que hoy en día permanecen en el grupo Cristina Blázquez, Mar Lorente, Sonia Hernández, Eduardo Pérez, Zaira Ortega, Luigi Bellocchio, María Salazar, Clara Andradas, Javier Díaz, Anna Chiarlone, Eva Resel, Elena García, Adán de Salas, Israel Valero, Sandra Blasco y David Vega.

Por último, y no por ello desde luego menos importante, estoy muy agradecido a esta Academia por acogerme entre sus miembros y, sobre todo, a su Presidenta, la Profesora María Teresa Miras Portugal, por marcar la pauta de las muy interesantes actividades y logros de dicha Academia y por toda la ayuda y cariño que me ha deparado prácticamente desde que comencé mi carrera científica, además, claro está, de por sus amables palabras de presentación.

A todas estas personas, y a muchas otras que por falta de tiempo no puedo nombrar, les agradezco de corazón todo lo que han hecho por mí.

Algunas veces, aunque en el fondo como mero divertimento intelectual, pienso en si he tenido vocación científica. En realidad me resulta muy difícil establecerlo, y de hecho todavía a estas alturas no consigo tener claro si en algún momento de mi vida me surgió una verdadera “vocación” (al menos entendida como “llamamiento” o “inspiración”) por la Ciencia. Más bien hablaría de que, durante la adolescencia, confluyó en mí un cúmulo de muy diversas influencias y contextos que me condujeron a una, digamos, “inclinación” por la Ciencia, a la que, por otro lado, nunca vi “enfrentada a” sino más bien “complementaria con” otras facetas del conocimiento como las Humanidades y el Arte. Lo que sí recuerdo nítidamente es que, desde pequeño, sentí una gran curiosidad por intentar entender y explorar la Naturaleza, incluida la humana, fundamentalmente desde una perspectiva biológica. Por ejemplo, siempre me fascinaron cuestiones como la química de la nutrición, las causas de las enfermedades y el funcionamiento del cerebro. En el fondo creo que intentaba aproximarme (en aquel momento de manera intuitiva, casi diría que inconsciente) al clásico triángulo cuerpo-mente-alma a través del conocimiento del primero de sus vértices. De hecho, éste ha sido el hilo conductor más profundo que ha sustentado mi pulsión y motivación por la actividad investigadora, que, hasta ahora, ha estado centrada en el estudio de una de las principales macromoléculas de nuestro organismo, los lípidos, sobre todo en dos órganos (primero el hígado en mis etapas pre y posdoctoral, posteriormente el cerebro en mis etapas más *senior*) y tanto en lo que se refiere a su metabolismo (primero) como a su papel señalizador (después).

Aunque esta carrera científica ha sido bastante gratificante y enriquecedora, también soy consciente de que he cometido errores, y de que algunas carencias que me ha costado tiempo y esfuerzo solventar podrían haberse solucionado más fácilmente en su debido momento. Sin embargo, una de las decisiones de las que no me arrepiento en absoluto es la de haber desarrollado toda mi carrera en la Universidad y, de esta manera, haber podido y poder contribuir (aunque sea a muy

pequeña escala) a la formación de algunas personas. En estos tiempos que nos toca vivir, en los que el mercantilismo más despiadado se ha adueñado no ya de la política y la economía de altos vuelos sino del día a día de muchos ciudadanos de a pie, no me parece necesariamente deseable que la Universidad se deba adaptar a esa Sociedad, como muchas veces se nos pide, sino que, por el contrario, la Universidad debería tratar de reconducir este devenir muchas veces errático de nuestra Sociedad. Así, aunque a veces el ajeteo cotidiano de nuestra labor docente e investigadora nos pueda hacer olvidarlo, a mi modo de ver la transmisión de valores como la solidaridad, la honestidad y el pensamiento crítico es no ya “una” sino “la” tarea esencial de nuestra institución. Ojalá que entre todos seamos capaces de conseguirlo.

En el marco de las moléculas sobre las que he centrado mayoritariamente mi carrera investigadora, esto es, los lípidos, mi disertación científica versará, como reza su título, sobre unas moléculas de naturaleza lipídica que actúan como mensajeros químicos en nuestro organismo y sobre las cuales nuestro grupo ha estado investigando activamente durante los últimos años. Se trata de los endocannabinoides.

La marihuana (*Cannabis sativa* L.) es la droga ilegal más ampliamente consumida en Occidente. Químicamente hablando se trata de la única especie del Reino Vegetal que, por lo que hoy en día sabemos, produce “cannabinoides”, una familia de moléculas de la cual ya conocemos casi un centenar de representantes diferentes. Aunque no se han estudiado con detalle las propiedades farmacológicas de la mayoría de estos compuestos, está ampliamente aceptado que el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) es el más importante de ellos debido tanto a su alta abundancia en la planta como a su elevada potencia de acción. Otros cannabinoides, como el cannabinal y el cannabidiol, pueden aparecer así mismo en niveles significativos en la planta y sus preparados, pero su potencia de acción es claramente más reducida que la del THC.

Desde hace aproximadamente 20 años sabemos que el THC ejerce su gran variedad de efectos, tanto en el sistema nervioso central como en distintas localizaciones periféricas, debido a que es similar a una familia de moléculas producidas por nuestro organismo y cuya acción por tanto mimetiza. Estas moléculas se denominan por ello “cannabinoides endógenos” o “endocannabinoides”, y, químicamente hablando, se trata de una familia más de derivados bioactivos del ácido araquidónico, esto es, el ácido eicosatetraenoico (20 átomos de carbono y cuatro dobles enlaces *cis* en las posiciones 5, 8 11 y 14), el cual, como bien sabemos, se emplea de precursor para la generación de un gran número de mensajeros químicos en nuestro organismo. En concreto, los endocannabinoides comprenden dos compuestos de naturaleza eicosanoide: por un lado, la *N*-araquidoniletanolamina (AEA), esto es, la amida del ácido

araquidónico y la etanolamina (generalmente conocida como “anandamida”, con el sufijo “amida”, que denota el enlace químico característico de la molécula, y el prefijo sánscrito “ananda”, que significa “embeleso” o “placer interno”, en alusión a los efectos que produce ingerir marihuana). Por otro lado, el 2-araquidonilglicerol (2-AG), esto es, el éster del ácido araquidónico y el grupo hidroxilo en posición *sn*-2 del glicerol.

Los cannabinoides de *C. sativa* actúan pues en el organismo a través de las mismas dianas moleculares que los cannabinoides endógenos. Se trata de receptores específicos localizados en la membrana plasmática de nuestras células y que se denominan receptores cannabinoides (abreviadamente receptores CB), de los cuales existen hoy en día dos tipos bien caracterizados molecular y funcionalmente hablando: el receptor cannabinoide de tipo 1, o receptor CB<sub>1</sub>, y el receptor cannabinoide de tipo 2, o receptor CB<sub>2</sub>. Es posible no obstante que existan en el organismo otros receptores, como algunos receptores acoplados a proteínas G aún huérfanos (por ejemplo, GPR55) o algunos canales iónicos (por ejemplo, TRPV1), que medien algunas de las acciones de los (endo)cannabinoides.

Los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> pertenecen a la principal superfamilia de receptores del organismo (los receptores acoplados a proteínas G) y señalizan principalmente a través de proteínas G<sub>i</sub>. Así, estos receptores modulan rutas de señalización intracelular de gran importancia como la clásica vía de la adenil ciclasa (AC)-adenosina monofosfato cíclico (cAMP)-proteína quinasa A (PKA) y, como veremos más tarde, afectan también a la conductancia de algunos canales de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>. Además, nuestro grupo ha contribuido a caracterizar el acoplamiento de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> a otras rutas de comunicación intracelular como la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt, la cascada de proteína quinasas activadas por mitógenos ERK (quinasa regulada por señales extracelulares; *extracellular signal-regulated kinase*), las cascadas de proteína quinasas activadas por estrés JNK (quinasa del extremo *N*-terminal de *c-Jun*, *c-Jun N-terminal kinase*) y p38, y la generación del mediador esfingolipídico ceramida. Éstos y otros mecanismos participan en el control de muy diversas funciones celulares por los receptores cannabinoides.

Como parece lógico suponer, únicamente los tejidos del organismo que poseen receptores específicos para cannabinoides son blanco de la acción de estos compuestos. En concreto, la mayor parte de los efectos de los cannabinoides están mediados por el receptor CB<sub>1</sub>, inicialmente denominado “receptor central de cannabinoides” por su localización mayoritariamente cerebral pero que hoy en día sabemos posee una localización muy ubicua. Este receptor es especialmente abundante en áreas del sistema nervioso central implicadas en el control de la actividad motora (ganglios basales, cerebelo), memoria y aprendizaje (corteza, hipocampo), emociones (amígdala), percepción sensorial (tálamo) y diversas

funciones autónomas y endocrinas (hipotálamo, médula), lo que lógicamente explica que los endocannabinoides modulen estos procesos y que el consumo de marihuana interfiera con ellos. El receptor CB<sub>1</sub> está también presente, por ejemplo, en las terminales nerviosas periféricas que inervan tanto la piel como los tractos digestivo, circulatorio y respiratorio, así como en numerosos tejidos y órganos como el endotelio vascular, hueso, testículo, útero, ojo, hígado y tejido adiposo.

El receptor CB<sub>2</sub>, inicialmente denominado “receptor periférico de cannabinoides” frente al “receptor central de cannabinoides” (CB<sub>1</sub>), muestra una distribución más restringida que el receptor CB<sub>1</sub>, y está fundamentalmente presente en el sistema inmune, tanto en células periféricas (por ejemplo, linfocitos y monocitos/macrófagos) como en tejidos (por ejemplo, bazo y ganglios linfáticos). Así, este receptor está implicado en la modulación de la respuesta inmune por el sistema endocannabinoide.

Los endocannabinoides, junto con sus receptores y sistemas específicos de síntesis y degradación, constituyen en el organismo el denominado “sistema endocannabinoide” o “sistema cannabinoide endógeno”. Este sistema (o al menos parte de sus componentes) aparece de forma altamente conservada en la gran mayoría de animales, al menos en todos los deuteróstomos, y su función hasta ahora mejor establecida es la de constituir un mecanismo de neuromodulación retrógrada en el sistema nervioso central. Así, cuando se sobreactivan diversos receptores de neurotransmisores en la membrana plasmática de una neurona postsináptica, ésta sintetiza precursores de endocannabinoides y los escinde para liberar a la hendidura sináptica endocannabinoides funcionalmente activos. Esto acontece, por ejemplo, tras la unión de algunos neurotransmisores como el glutamato a sus receptores ionotrópicos o metabotrópicos, con la consiguiente elevación de la concentración citoplasmática de Ca<sup>2+</sup>. Los endocannabinoides actúan entonces como mensajeros químicos retrógrados, esto es, se unen a receptores CB<sub>1</sub> de la neurona presináptica, lo que induce por ejemplo que se dificulte la entrada en ella de iones Ca<sup>2+</sup> (por el cierre de canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a potencial) y se facilite la salida de iones K<sup>+</sup> (por la apertura de canales rectificadores de K<sup>+</sup> sensibles a proteínas G). Ello dificulta la despolarización de la membrana plasmática e inhibe los procesos de excitación. De esta manera se bloquea la liberación del neurotransmisor correspondiente (como el glutamato en este ejemplo).

La acción neuromoduladora de los endocannabinoides, al igual que la de muchos otros neurotransmisores y neuromoduladores, finaliza mediante su recaptura celular a través de un sistema de transporte de membrana plasmática y su posterior degradación intracelular, que corre a cargo de una familia de lipasas entre las cuales la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (*fatty acid amide hydrolase*,



FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) son las mejor caracterizadas para la rotura de la AEA y el 2-AG, respectivamente.

El receptor CB<sub>1</sub> cannabinoide es en general uno de los tipos de receptores más altamente expresados en el sistema nervioso central y, en concreto, es el receptor presináptico acoplado a proteínas G más abundante en el cerebro adulto de los mamíferos hasta ahora estudiados, hallándose presente, como hemos mencionado, en prácticamente todas las regiones de este órgano. La localización presináptica del receptor CB<sub>1</sub> fue mostrada por vez primera en terminales axonales de interneuronas hipocampales, y hoy en día se conocen numerosos ejemplos de otras neuronas GABAérgicas (por ejemplo, corticales y estriatales), así como glutamatérgicas (por ejemplo, corticales, hipocampales, hipotalámicas y cerebelares) o de vías subcorticales ascendentes (por ejemplo, terminales colinérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas), que expresan altas cantidades de receptores CB<sub>1</sub> presinápticos. Aunque el resultado global de la activación de dichos receptores es la retroinhibición de la liberación de neurotransmisores y la consiguiente atenuación de la transmisión sináptica, el curso temporal en el que tiene lugar este proceso divide los efectos de los cannabinoides y endocannabinoides sobre la plasticidad sináptica en dos grandes tipos, que pueden además poseer distintas implicaciones fisiopatológicas. Así, la depresión sináptica a corto plazo se inicia muy rápidamente (menos de 1 s) y su duración es muy corta (s-min), mientras que la depresión sináptica a largo plazo requiere periodos más largos de inducción (s-min) y su duración es más larga (h). Aunque ambos procesos están mediados por la activación de receptores CB<sub>1</sub> presinápticos, los mecanismos señalizadores responsables de cada uno de ellos son diferentes. Así, la depresión a corto plazo suele implicar, como hemos visto, la inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> y la apertura de canales de K<sup>+</sup>, mientras que la depresión a largo plazo depende mayoritariamente de la inhibición de la vía del cAMP.

Además de esta localización característica en terminales presinápticas, se ha descrito la existencia de receptores CB<sub>1</sub> en algunas neuronas postsinápticas, cuya activación inhibe los canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a potencial y los receptores ionotrópicos de glutamato de tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Los receptores CB<sub>1</sub> del sistema nervioso central también se expresan en astrocitos, donde podrían controlar el aporte trófico de estas células a las neuronas y los procesos de comunicación sináptica entre ambos tipos de células, así como en oligodendrocitos y en células del endotelio vascular. Por último, el receptor CB<sub>2</sub> cannabinoide se expresa en células de microglía, los macrófagos residentes del tejido nervioso, donde inhibe la activación de dichas células y producen por tanto un descenso en la liberación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo que conlleva a su vez una atenuación de los procesos neuroinflamatorios. Todos estos efectos complementan la acción de mensajeros

retrógrados que ejercen los endocannabinoides sobre la plasticidad sináptica y la funcionalidad neuronal.

El sistema endocannabinoide no sólo se expresa en el sistema nervioso adulto, sino que, como ha demostrado nuestro grupo y otros laboratorios, también lo hace en el cerebro en desarrollo, en el cual evidencia un patrón de distribución “atípico”, ya que, por ejemplo, durante etapas prenatales el receptor CB<sub>1</sub> abunda en células progenitoras neurales y en proyecciones axonales que conforman áreas de sustancia blanca. Los estudios más recientes sugieren que, durante el desarrollo cerebral, el sistema endocannabinoide controla procesos esenciales como la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de células neurales, así como la elongación y fasciculación de axones y la formación de conexiones sinápticas durante el establecimiento de los patrones morfogenéticos del sistema nervioso. Una reminiscencia de este papel del sistema endocannabinoide durante el desarrollo sería, como ha descrito nuestro grupo, su presencia y actividad funcional en células progenitoras residentes en regiones neurogénicas del cerebro adulto como la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo.

La marihuana y sus preparados se han empleado en Medicina desde hace al menos cincuenta siglos. Los descubrimientos recientes en el conocimiento del sistema endocannabinoide que he resumido hasta ahora han contribuido al renacimiento del estudio de las posibles aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides, lo que constituye hoy en día un campo de amplio debate científico y clínico. Con base en la demostración de la función moduladora que los endocannabinoides ejercen sobre numerosas funciones cerebrales, se ha sugerido el potencial terapéutico que la manipulación farmacológica de sus niveles o la administración de agonistas cannabinoides (bien cannabinoides de la planta, bien cannabinoides sintéticos) podría tener en el tratamiento de diversas patologías que afectan al sistema nervioso. En algunas de estas enfermedades ya se ha podido poner de manifiesto que existen cambios en la expresión de receptores cannabinoides y/o en los niveles de endocannabinoides en ciertas zonas del cerebro, lo que justificaría el estudio farmacológico de este sistema. Por ejemplo, y de forma general, los cannabinoides ejercen efectos analgésicos que los harían de utilidad en el tratamiento del dolor. También podrían ser útiles en el tratamiento de los procesos de neuroinflamación, en los que su administración permitiría paliar algunas consecuencias típicas de dichos desórdenes. Hoy en día sabemos además que, bajo determinadas ventanas terapéuticas, los cannabinoides son capaces de proteger a las neuronas frente a diversas situaciones de daño, lo que podría tener interés para el tratamiento de episodios de daño cerebral agudo y quizás de enfermedades neurodegenerativas. Su participación en los procesos de memoria hace pensar que los cannabinoides podrían ser de utilidad en trastornos como la extinción de memorias aversivas en situaciones de estrés post-traumático.

Análogamente, la presencia de receptores cannabinoides en regiones del sistema límbico y el hipotálamo anterior permitiría que la manipulación de dichos receptores pudiera ser una aproximación farmacológicamente relevante en el tratamiento de trastornos alimentarios y metabólicos, así como de fenómenos compulsivos relacionados con la adicción a drogas.

A pesar de todo ello, la utilización clínica de los cannabinoides y otros compuestos que afectan a la señalización cannabinérgica es hoy en día bastante restringida. En la actualidad se permite en algunos países la prescripción de cápsulas de THC (Marinol) y del cannabinoide sintético nabilona (Cesamet), así como la dispensa de preparaciones estandarizadas de marihuana medicinal, para inhibir la náusea y el vómito, estimular el apetito y atenuar la caquexia en pacientes de cáncer o sida. Recientemente se ha aprobado un nuevo medicamento cannabinoide, el Sativex, un aerosol oro-mucosal compuesto por extractos de cannabis ricos en THC y cannabidiol, para el tratamiento del dolor oncológico y neuropático (hasta ahora solo en Canadá) y de la espasticidad asociada a la esclerosis múltiple (en varios países, incluida España). Existen además otras posibilidades terapéuticas de los cannabinoides que se hallan aún en diversas fases de ensayos clínicos.

Los cannabinoides son sustancias bastante seguras en el contexto de su aplicación clínica, pero su uso médico está en parte dificultado por sus efectos psicoactivos no deseados, entre los que se incluyen los de tipo afectivo (euforia), somático (somnolencia, descoordinación motora), sensorial (alteraciones en la percepción temporal y espacial, desorientación) y cognitivo (lapsos de memoria, confusión). Aunque dichos efectos secundarios puedan ser transitorios y estar dentro de los márgenes aceptados para otros medicamentos, está claro que, al menos para determinados pacientes y patologías, sería deseable diseñar cannabinoides que carecieran de acciones psicotrópicas. Puesto que éstas dependen de los receptores CB<sub>1</sub> centrales, la opción más lógica sería evitar la activación de dichos receptores (siempre que la patología en cuestión lo haga viable). Así, por ejemplo, se están diseñando cannabinoides que se unen selectivamente al receptor CB<sub>2</sub> y cannabinoides que no atraviesan la barrera hematoencefálica y por tanto no alcanzan el sistema nervioso central. Por otro lado, la administración a animales de experimentación de inhibidores de la degradación (recaptura o hidrólisis intracelular) de endocannabinoides ha permitido conseguir la elevación de los niveles de estos compuestos en contextos espacio-temporales restringidos y, de esta manera, la inducción de efectos por ejemplo bradiquinéticos, ansiolíticos o analgésicos sin efectos secundarios notorios. Este tipo de compuestos todavía no ha sido, sin embargo, objeto de ensayos clínicos exitosos.

En este contexto del conocimiento general del campo, nuestro grupo de investigación comenzó a estudiar hace ya unos 15 años los mecanismos moleculares por los cuales los cannabinoides, tanto los endógenos como los de la planta, actúan en el organismo. Más concretamente, nuestro interés se centró en dilucidar si estos compuestos son capaces de alterar algunos procesos centrales de la biología celular como la proliferación, diferenciación y supervivencia, sobre todo (aunque no exclusivamente) en el sistema nervioso. La comprensión de estos eventos es esencial para el conocimiento preciso de procesos biológicos como el desarrollo del sistema nervioso, así como para la caracterización de la etiología y progresión de las enfermedades neurodegenerativas (caracterizadas por la disfunción y pérdida de células nerviosas) y de los procesos oncológicos (caracterizados por una proliferación y supervivencia celulares desmesuradas) y, por tanto, para el diseño de terapias racionales para su tratamiento. Estos tres paradigmas concretos constituyen la base de los principales proyectos de investigación que nuestro grupo lleva a cabo hoy en día.

Por ejemplo, y de forma muy resumida, a lo largo de este tiempo hemos observado que, tras unirse a sus receptores, los cannabinoides modulan numerosas vías de señalización intracelular en distintos tipos de células neurales, lo cual se traduce en efectos tales como la estimulación de la proliferación de células progenitoras neurales para generar neuronas y células de neuroglía, la protección y supervivencia de neuronas y células de neuroglía, la desactivación de células de microglía y la inducción de muerte programada en células tumorales de origen glial (glioma). Estos acontecimientos celulares tienen una clara relevancia fisiológica en animales de laboratorio, en los cuales se observa cómo los cannabinoides, por ejemplo, controlan el desarrollo de la corteza cerebral, contribuyen a la regeneración y protección del tejido nervioso en situaciones de daño, e inhiben el crecimiento de tumores malignos.

En este último terreno del cáncer, nuestros estudios apoyan que, al contrario que otros sistemas de señalización dependientes de mensajeros lipídicos como los prostanoïdes (aquí representados por la prostaglandina E2), el ácido lisofosfatídico o la esfingosina 1-fosfato, que median señales oncogénicas a través de sus receptores específicos acoplados a proteínas G, los endocannabinoides, activando sus receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, podrían constituir un nuevo sistema endógeno de defensa antitumoral. Además, nuestro grupo ha demostrado que la activación farmacológica de estos receptores inhibe significativamente el crecimiento de muy diversos tipos de células tumorales en modelos animales de cáncer a través de un mecanismo molecular de acción específico y ya bien definido, lo cual sugiere que los compuestos cannabinoides podrían constituir fármacos para el diseño de nuevas terapias antineoplásicas.

De forma general, nuestra investigación ha desvelado que los receptores cannabinoides están implicados en el control de decisiones básicas de las células de nuestro organismo y quizás podrían pues constituir nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de algunas enfermedades actualmente huérfanas. La comunidad científica se encuentra hoy en día en un punto en el cual se ha acumulado un conocimiento relativamente bueno de cómo actúan molecularmente los cannabinoides en el organismo y de cuáles pueden ser algunas de sus aplicaciones terapéuticas más inmediatas. Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigación básica más profunda y ensayos clínicos más exhaustivos para comprender más sólidamente la función biológica y el potencial terapéutico de estos nuevos mensajeros químicos de nuestro organismo. La intención global de nuestro grupo es poder contribuir con un granito de arena lo más grande posible a este campo del conocimiento científico actual.

He dicho.

### ANALES VOL 2 2012

En el editorial “Discurso de agradecimiento de la Excma. Sra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal, Presidente de la RANF, en la entrega del Premio Miguel Catalán de la Comunidad de Madrid”, hemos observado dos erratas en la página 145, párrafo 3. Donde dice 1011, debe decir  $10^{11}$  y donde dice 1015, debe decir  $10^{15}$ , por lo que la redacción de ese párrafo es ahora:

“Nuestra ambición es conocer lo que pasa en el cerebro humano. Tarea compleja que requiere una pequeña parábola: Llevamos jugando al ajedrez casi dos mil años, con 32 piezas, moviéndose en 64 casillas, con unas normas rígidas y ¡Aun no hemos sido capaces de agotar todas sus posibilidades! ¿Cuántos años necesitaremos para identificar las posibilidades del cerebro humano con sus 100.000 millones de neuronas,  $10^{11}$ , que son sus piezas de juego y su cableado de axones que permite formar 1.000 billones de conexiones sinápticas,  $10^{15}$ , que son las casillas sobre las que se mueven? Estas cifras son realmente difíciles de imaginar, aunque comiencen a resultarnos familiares en esta época de déficits y quiebras”.

En las noticias científicas: análisis, sobre “Fármacos inmunoconjugados en la terapia del cáncer”, de la que es autora Carmen Avendaño, hemos observado las siguientes erratas:

1) En la página 163, antes de la Figura 1, dice: .....que se enlaza a residuos de lisina al anticuerpo.... y debe decir: .....que se enlaza a residuos de lisina del anticuerpo....

2) En la página 164, antes de la Figura 2, tras Adcetris®, debe haber un punto, no una coma.

3) En la página 167, Conclusión, dice:” .....una citotoxina se ha denominado "atomic missils", .....” pero debe decir: “.....una citotoxina se han denominado "atomic missiles",...”. La redacción del párrafo queda:

“Hace 35 años, aproximadamente, los anticuerpos monoclonales se definieron como “magic bullets” siendo los medicamentos que más se han expandido para tratar varias enfermedades, incluido el cáncer (8). Los conjugados con una citotoxina se ha denominado “atomic missiles”, por lo que habrá que pensar que son el arma más potente que existe en la lucha contra el cáncer. El tiempo nos lo dirá.



