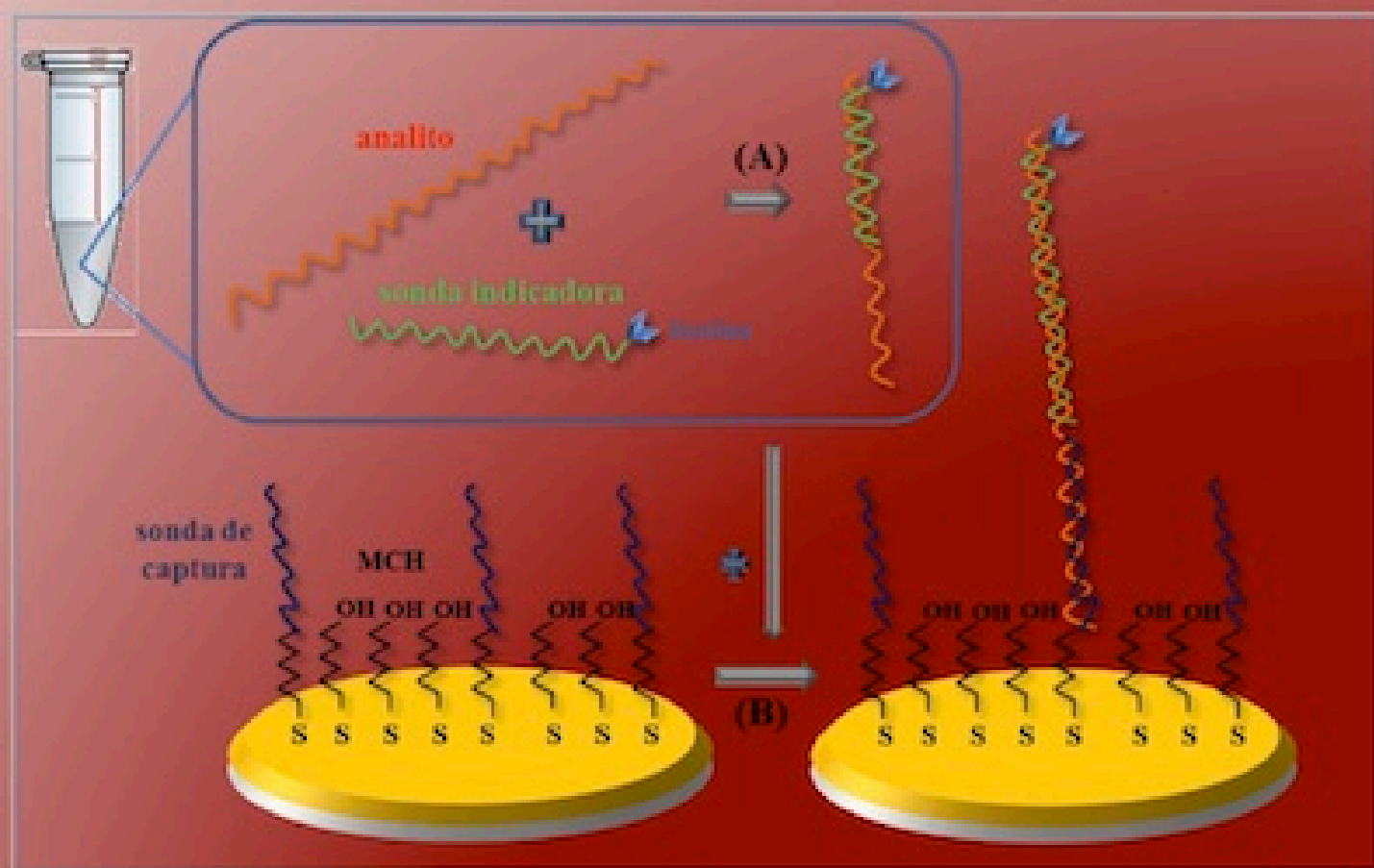


ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 80 | Número 2 | Abril-Junio 2014 | Páginas 239-452



www.analesranf.com

ISSN 1697-4271



REAL ACADEMIA
NACIONAL DE
FARMACIA



Instituto
De España



Ministerio de
Educación
Cultura y Deporte

Publicación científica electrónica trimestral

Madrid, Spain



Mª del Carmen Avendaño López

Catedrática de Química Orgánica
Académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

“United States to approve potent oral drugs for hepatitis C. Improved treatments offer hope for eradication of viral liver infection”

Nature News 2013 doi:10.1038/nature.2013.14059

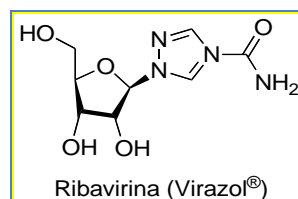
La FDA aprobó el 6 de diciembre de 2013 el fármaco sofosbuvir (Sovaldi®) y la EMA lo hizo el 17 de enero de 2014. Su precio ha generado una enorme controversia entre los que opinan que es inabordable y los que lo justifican por las ventajas que supone frente a tratamientos anteriores. Sofosbuvir forma parte de un grupo de nuevos fármacos contra el virus de la hepatitis C (HCV), desarrollados por distintas compañías que quieren conseguir una parte de este jugoso mercado.

COMENTARIOS SOBRE LA HEPATITIS C, PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Uno de los mayores problemas inherentes al uso de transfusiones de sangre es la presencia de agentes infecciosos que no han sido detectados en la sangre de los donantes. Entre ellos podrían encontrarse los virus HCV y HIV, causantes de la hepatitis C y del SIDA respectivamente. Tras conocerse en los años 1970 que existía un tipo de hepatitis diferente a las entonces conocidas (A y B), tuvieron que transcurrir casi 20 años para que en 1989 se identificara el virus de la hepatitis C y se desarrollara un test diagnóstico (1). Los test diagnósticos, generalizados en USA en 1992, redujeron el riesgo de contagiarse con el virus de la hepatitis C de un 30% en 1970 a prácticamente un 0% en el año 2000. Mientras tanto, como hasta finales de los años 80 el virus HCV no se analizaba en las donaciones de sangre, muchas personas se infectaron a través de estas transfusiones o compartiendo agujas inyectables. Hay dos tipos de hepatitis C: la aguda y la crónica. En la primera, el cuerpo es capaz de liberarse del virus por sí solo, pero de un 75 a un 85% de los pacientes infectados puede desarrollar hepatitis crónica y graves problemas hepáticos. Según la OMS, del 60 al 80% de las personas con hepatitis C crónica no tienen síntomas, pero cuando estos aparecen, el hígado ya ha comenzado a dañarse por cirrosis o, en casos muy avanzados, por carcinoma

hepático. Todavía no existe ninguna vacuna que sea preventiva contra la hepatitis C y, aunque es posible generar respuestas inmunes celulares amplias que duren por lo menos un año, parecen necesitarse muchos más esfuerzos para conseguir el éxito en este campo.

La hepatitis C es la causa más importante de los trasplantes de hígado, aunque el tratamiento antiviral ha de continuarse después del trasplante debido a que, incluso los fármacos orales más activos, son incapaces de estimular una respuesta inmune duradera, por lo que un paciente puede ser reinfectado. Por otra parte, dado que este virus progresa muy lentamente, es posible encontrar las complicaciones hepáticas graves que hemos mencionado transcurridos 20, 30 o 40 años desde su infección. El pronóstico y la expectativa de vida de estos pacientes depende del daño hepático y de la respuesta a los tratamientos. El número de enfermos contagiados con el virus de la hepatitis C (HCV) supone un 3% de la población mundial, unos 170 millones de personas, de las que 9 millones residen en la Unión Europea. Estos enfermos se han tratado durante décadas con combinaciones de fármacos. En una de las más utilizadas se combina el interferón α , un activante del sistema inmune que también se usa en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y se administra como inyectable, con ribavirina administrada por vía oral. La ribavirina (Virazol®) es un análogo de un nucleósido de purina en el que la base nitrogenada es triazolcarboxamida. Es un antiviral de amplio espectro que, en el caso de la hepatitis C, ejerce su efecto antiviral a través de diversos mecanismos, entre ellos produciendo en el virus una mutagénesis letal (3). En esta combinación, el interferón α puede reemplazarse por peginterferón α (PEG-intron), que se administra por vía subcutánea en el abdomen o en el muslo. Estas combinaciones pretenden estimular el sistema inmune y, a la vez, matar el virus.



El éxito de los tratamientos de la hepatitis C crónica dependen a su vez del genotipo del virus infectante. En USA, un 75% de los pacientes infectados tienen el genotipo 1 (el más difícil de curar), entre un 20 y un 25% tienen el genotipo 2 o el 3, y un pequeño porcentaje posee los genotipos 4, 5 o 6. Los pacientes con genotipos 2 ó 3 tienen más posibilidades de curarse totalmente que los del genotipo 1 y, además, sus tratamientos son más cortos.

LA CARRERA PARA ENCONTRAR NUEVOS TRATAMIENTOS ANTI HCV

En breve, los importantes efectos secundarios que produce el interferón podrían eliminarse con la reciente o inminente aprobación de fármacos antivirales orales, muy eficaces, que interfieren la replicación del virus y su capacidad para fabricar sus propias proteínas. Según los expertos, la erradicación de esta enfermedad en el mundo es ahora al menos en teoría un objetivo realista, ya que este virus no tiene ningún reservorio animal, la enfermedad se desarrolla muy lentamente, y las personas no se contagian fácilmente si no es a través de la sangre u otros fluidos corporales contaminados. La FDA aprobó el 6 de diciembre de 2013 el fármaco sofosbuvir (Sovaldi®) en combinación con ribavirina (RBV) para el tratamiento oral de la hepatitis C producida por los genotipos 2 y 3, mientras que para los genotipos 1 y 4 se requiere un tratamiento triple con la adición de interferón pegilado. La EMA lo hizo el 17 de enero de 2014. Sofosbuvir, descubierto por la empresa Pharmasset pero desarrollado por Gilead Sciences, es en realidad un profármaco que se metaboliza originando el fármaco activo 2'-desoxi-2'- α -fluoro- β -C-metiluridina-5'-trifosfato, un antimetabolito que inhibe la polimerasa de ARN denominada NS5B, que es la enzima que utiliza el virus HCV para la síntesis de su ARN. Ya se conocían varios análogos de nucleósidos activos en la hepatitis C (la propia ribavirina), pero su potencia era muy baja debido a que la incorporación del primer grupo fosfato, necesaria para originar después el nucleótido trifosfato, es lenta. En sofosbuvir este grupo ya está presente, aunque se ha modificado para optimizar su farmacocinética enmascarando las dos cargas negativas del grupo fosfato a fin de facilitar su entrada en las células infectadas (Figura 1).

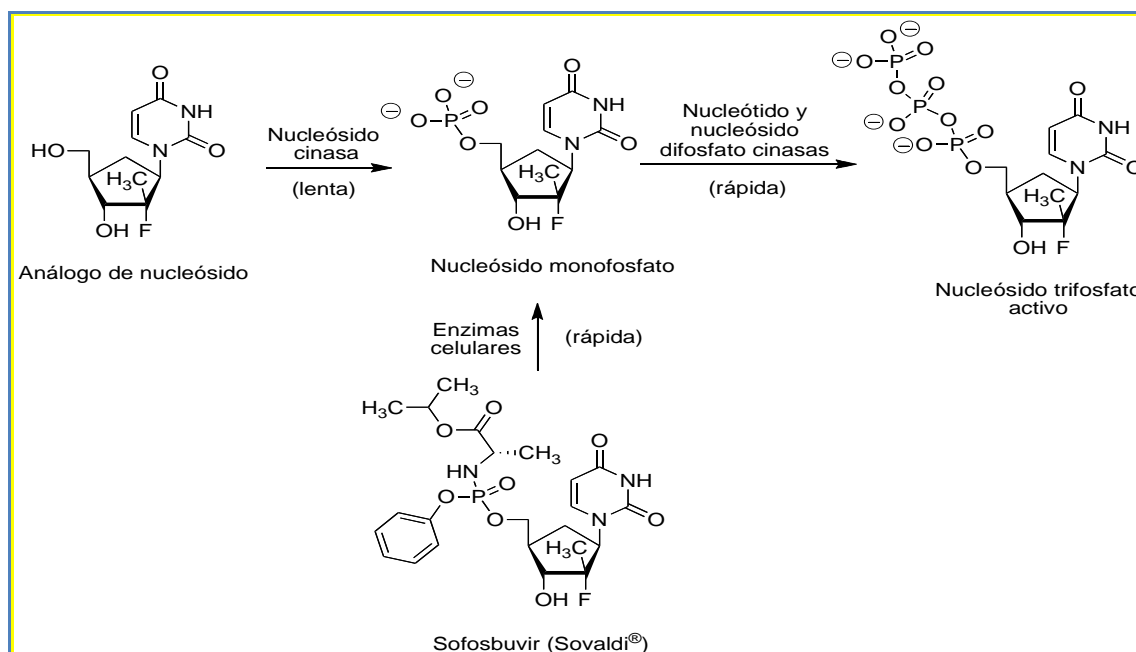
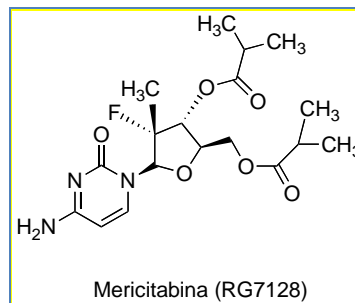


Figura 1.- Biotransformación del profármaco sofosbuvir en un nucleósido monofosfato y su siguiente difosforilación al nucleósido trifosfato activo.

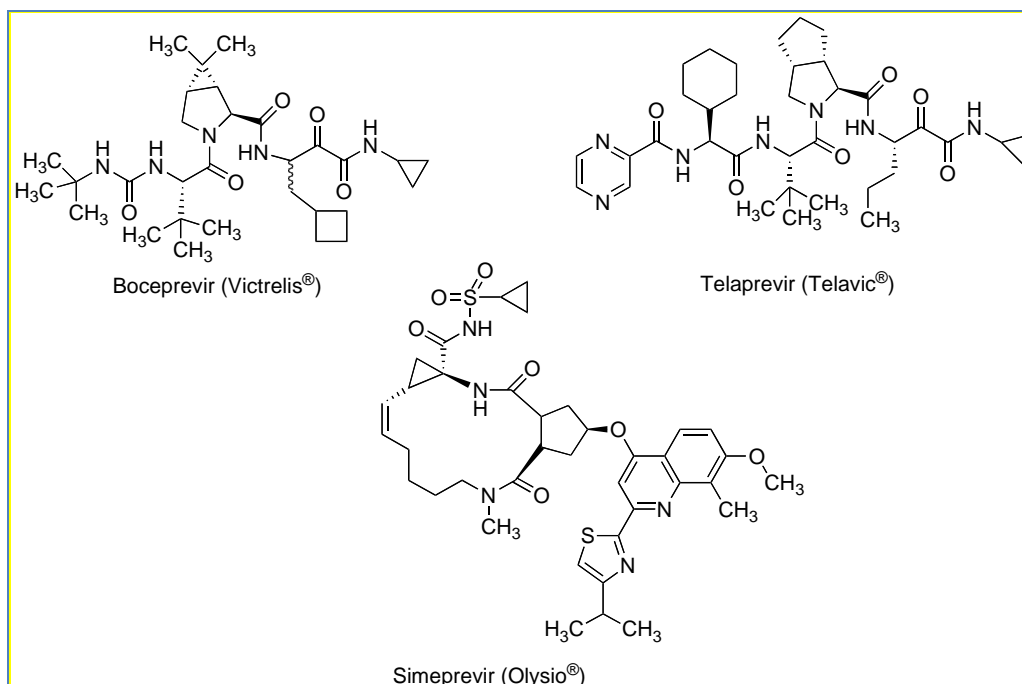
Los tratamientos que incluyen sofosbuvir son aproximadamente una mitad más cortos que los utilizados anteriormente, pero su principal ventaja es que en los genotipos 2 y 3 del virus puede omitirse el interferón y, por tanto, sus efectos secundarios. En estos regímenes libres de interferón, la neutropenia, fatiga, náuseas, dolor de cabeza, prurito e irritabilidad se ven muy reducidos o están prácticamente ausentes. Otra ventaja es que los nucleótidos inhibidores de la ARN polimerasa parecen poco proclives a desarrollar resistencias, mientras que los inhibidores de otras enzimas víricas, como por ejemplo la proteasa, las desarrollan rápidamente, lo que justifica en gran parte su fracaso en clínica. Aunque no puede descartarse que se desarrollen nuevos tipos de virus resistentes a estos nuevos tratamientos, parece que esta posibilidad no es fácil, debido fundamentalmente a su extremada potencia. Pharmasset ya tenía varios compuestos de este tipo en desarrollo, como mericitabina (RG7128) (4), un análogo del nucleósido citidina que se encuentra en estudios clínicos de fase II y se desarrolla en conjunción con Roche.



Desafortunadamente, sofosbuvir es un sustrato de la glicoproteína de transporte P (Pgp), por lo que los fármacos que la inducen podrían afectar su absorción intestinal. Sin embargo, el mayor problema para usar sofosbuvir es el precio del tratamiento, que se cifra entre 84.000 \$ (1.000 \$/día) para su uso en los genotipos 1 y 2 y 168.000 \$ para el tratamiento del genotipo 3, que requiere 24 semanas. En el Reino Unido su precio se calcula en 35.000 £. Este precio ha generado una enorme controversia entre los que opinan que es inabordable y los que piensan que está justificado por las ventajas que supone frente a tratamientos anteriores. La organización "Doctors of the World" lo ha criticado duramente (5), y es que, a diferencia de lo que ha ocurrido con los tratamientos anti-HIV que duran toda la vida de los pacientes, estos tratamientos pueden durar sólo 12 semanas por lo que las empresas farmacéuticas no tienen ningún incentivo para bajar los precios.

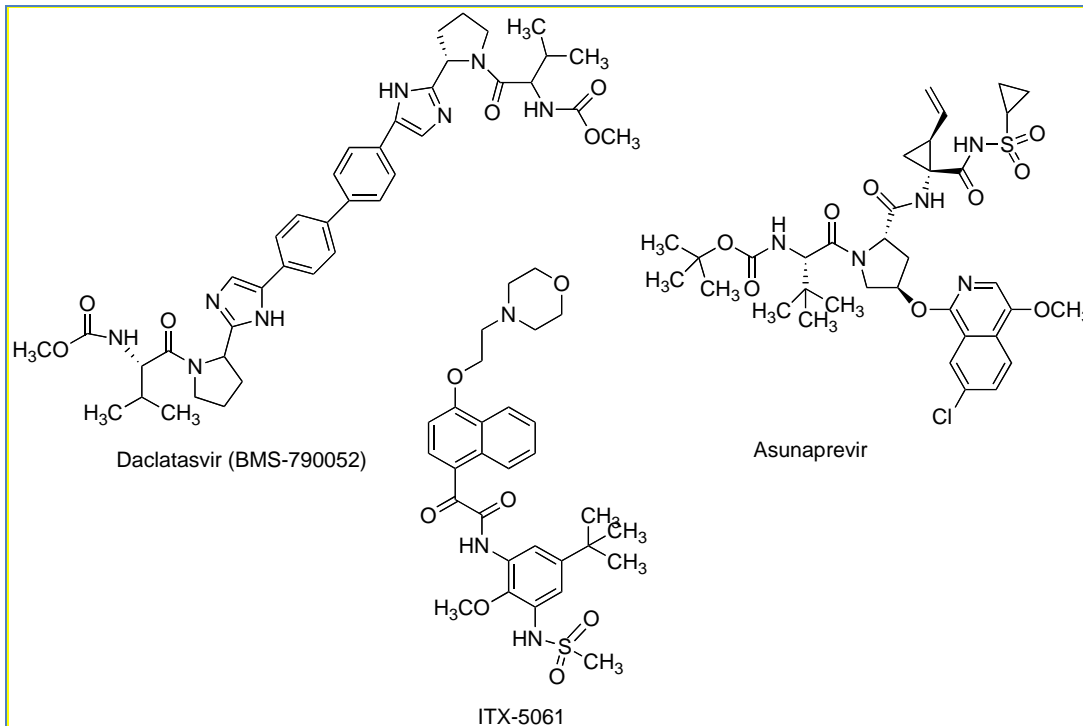
Sofosbuvir forma parte de un grupo de nuevos fármacos anti HCV de los que actualmente hay unos 60 compuestos en desarrollo preclínico o clínico, ya que todas las compañías quieren conseguir una parte de este jugoso mercado. Entre ellos se encuentran los inhibidores de la proteasa NS3/4A (esencial para que el virus produzca sus propias proteínas) boceprevir (Victrelis®) (6) desarrollado por

Shering-Plough y luego por Merck y aprobado por la FDA el 13 de Mayo de 2011, telaprevir (Telavic®) (7) desarrollado por Vertex y Jonson&Johnson y aprobado por la FDA el 23 de mayo de 2011, y simeprevir (Olysio®) (8), desarrollado por Janssen y aprobado también por la FDA el 22 de noviembre de 2013. Los tres están indicados para el tratamiento del genotipo 1 del virus HCV combinados con interferón pegilado y ribavirina.

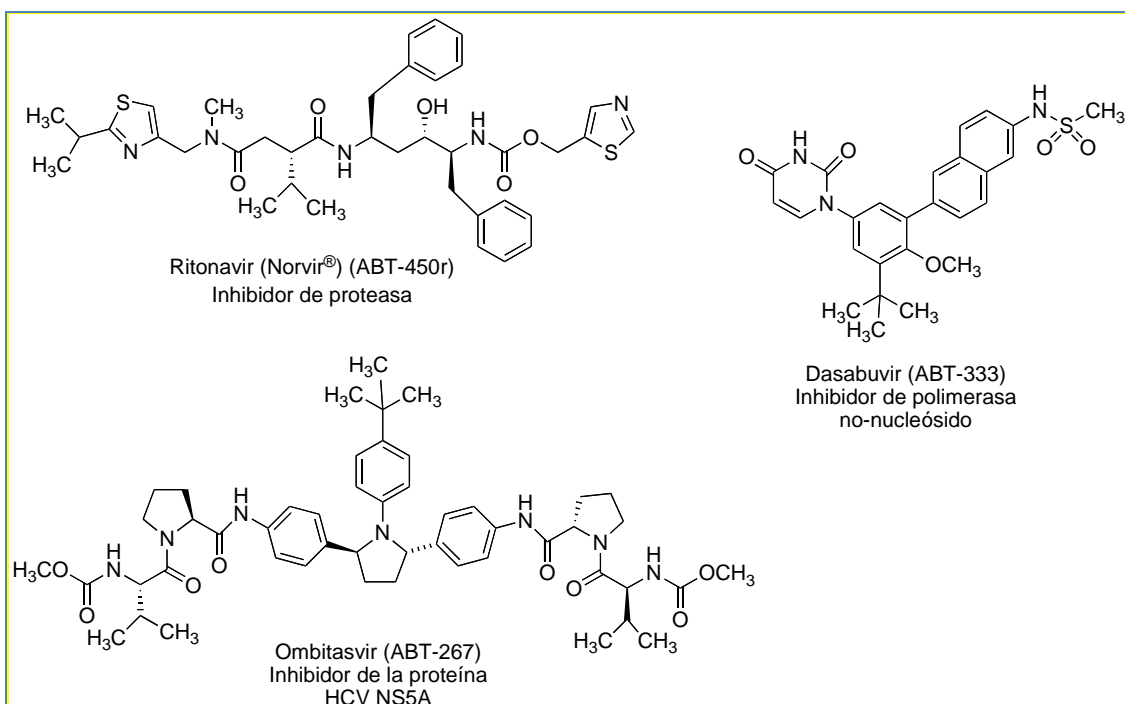


La firma Bristol-Myers-Squibb descubrió en el año 2010 una proteína del virus HCV llamada NS5A que, aunque no es una enzima, es esencial para la unión de las partículas virales infecciosas y para la amplificación del RNA1 vírico (9). Daclatasvir (10) es un inhibidor de esta proteína desarrollado por Bristol-Myers Squibb cuya aprobación se ha solicitado a la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Esta solicitud busca la aprobación de este fármaco en combinación con otros agentes, incluido sofosbuvir. Asunaprevir es un inhibidor de la proteasa NS3 que se encuentra en ensayos clínicos de fase III y está siendo desarrollado por la misma empresa (11). Otra estrategia ha sido tratar de parar la expansión del virus en el interior de un paciente impidiendo su entrada en otras células. Cuando un equipo de virólogos demostró en 2011 que este virus requiere la presencia de la proteína receptora denominada factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para penetrar en las células humanas (12), se planteó el estudio clínico de inhibidores EGFR que ya estaban comercializados como fármacos anticáncer, como erlotinib (Tarceva®). Otro mecanismo de entrada de HCV en las células humanas implica a la proteína de membrana denominada *scavenger* receptor B1 (SRB1), que funciona como un receptor de lipoproteínas de alta densidad facilitando su entrada

en el hígado. El compuesto ITX-5061 inhibe este mecanismo. Desarrollado por iTherX Pharmaceuticals, se encuentra en ensayos clínicos fase II.



Un nuevo régimen antiviral oral, desarrollado por AbbVie (una subdivisión de Abbott) en colaboración con Enanta, está formado por una combinación del inhibidor de proteasa ritonavir (ABT-450/r), el inhibidor de NS5A ombitasvir (ABT-267) y el inhibidor de polimerasa no nucleósido dasabuvir (ABT-333).



Este régimen ha sido calificado de revolucionario para el tratamiento del HCV del genotipo 1 ya que, según un ensayo clínico de fase III con 700 enfermos de hepatitis C sin cirrosis y sin tratamiento previo, ha logrado curar de esta patología al 96% de los pacientes (13). Doce semanas de tratamiento con esta combinación, sin ribavirina, produjo una respuesta antiviral sostenida entre los pacientes con genotipo HCV1b, mientras que la respuesta de los pacientes con genotipo HCV1a fue mejor incluyendo ribavirina. AbbVie confía en su pronta aprobación.

CONCLUSIÓN

En los nuevos tratamientos anti HCV se está siguiendo el camino del SIDA: añadir complejidad a los cócteles antivirales. De esta forma, es normal esperar un aumento de la eficacia, pero también de los efectos secundarios. Los especialistas advierten que hay que andar con cautela, ya que otro inhibidor de proteasa estudiado previamente por Boehringer Ingelheim, fue demasiado tóxico, y varios HCV inhibidores de polimerasa mostraron efectos secundarios inaceptables que impidieron su posterior desarrollo. Además, como ya hemos mencionado, los inhibidores de proteasa son muy proclives a desarrollar resistencias. Son muchos los que creen que en esta carrera por conseguir el éxito, los nucleósidos inhibidores de polimerasa (que impiden que el virus copie su genoma), de los que sofosbuvir es el primero en ser aprobado, serán ingredientes indispensables en cualquier cóctel anti-HCV.

REFERENCIAS

1. a) Choo, Q. L.; Kuo, G.; Weiner, A. J.; Overby, L. R.; Bradley, D. W.; Houghton, M.; (1989) "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome", *Science*, 244, 359-362. b) Kuo, G.; Choo, Q. L.; Alter, H. J.; Gitnick, G. L.; Redeker, A. G.; Purcell, R. H.; Miyamura, T.; Dienstag, J. L.; Alter, M. J.; Stevens, C. E.; *et al.*; (1989) "An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis", *Science*, 244, 362-364.
2. U.S. Department of Health & Human Services (2012) "Treating Chronic Hepatitis C: A Review of the Research for Adults", Retrieved November 11, 2013, from <http://effectivehealthcare.ahrq.gov/search-for-guides-reviews-and-reports>.
3. Ortega-Prieto, A. M.; Sheldon, J.; Grande-Pérez, A.; Tejero, H.; Gregori, J.; Quer, J.; Esteban, J. I.; Domingo, E.; Perales, C.; (2013) "Extinction of Hepatitis C Virus by Ribavirin in Hepatoma Cells Involves Lethal Mutagenesis", *PLoS ONE* 8, e71039. doi:10.1371/journal.pone.0071039.
4. Guedj, J.; Dari, H.; Shudo, E.; Smith, P.; Perelson, A. S.; (2012) "Hepatitis C viral kinetics with the nucleoside polymerase inhibitor mericitabine (RG7128)", *Hepatology*, 55, 1030-1037.
5. Waldman, R. (Doctors of the World); (2013) "Gilead's HCV drug sofosbuvir approved by the FDA but accessible for how many?" Press Release, December 9.
6. Njoroge, F. G.; Chen, K. X.; Shih, N. Y.; Piwinski, J. J.; (2008) "Challenges in modern drug discovery: a case study of boceprevir, an HCV protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection" *Acc. Chem. Res.* 41, 50-59.
7. Lin, C.; Kwong, A. D.; Perni, R. B.; (2006) "Discovery and development of VX-950, a novel, covalent, and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3/4A serine protease" *Infect. Disord. Drug Targets* 6, 3-16.

8. Lin, T. I.; Lenz, O.; Fanning, G.; Verbinnen, T.; Delouvroy, F.; Scholliers, A.; Vermeiren, K.; Rosenquist, A.; Edlund, M.; Samuelsson, B.; Vrang, L.; De Kock, H.; Wigerinck, P.; Raboisson, P.; Simmen, K. (2009) "In vitro activity and preclinical profile of TMC435350, a potent hepatitis C virus protease inhibitor" *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 53, 1377-1385.
9. Gao, M.; Nettles, R. E.; Belema, M.; Zinder, L. B.; Nguyen, V. N.; Fridell, R. A.; Serrano-Wu, M. H.; Langley, D. R.; Sun, J. H.; O'Boyle, D. R.; Lemm, J. A.; Wang, C.; Knipe, J. O.; Chien, C.; Colonna, R. J.; Grasela, D. M.; Meanwell, N. A.; Hamann, L. G. (2010) "Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect" *Nature*, 465, 96-100.
10. Lok, A. S.; Gardiner, D. F.; Lawitz, E.; Martorell, C.; Everson, G. T.; Ghalib, R.; Reindollar, R.; Rustgi, V.; McPhee, F.; Wind-Rotolo, M.; Persson, A.; Zhu, K.; Dimitrova, D. I.; Eley, T.; Guo, T.; Grasela, D. N.; Pasquinelli, C.; (2012) "Preliminary Study of Two Antiviral Agents for Hepatitis C Genotype 1", *New Engl. J. Med.* 366, 216-224.
11. Lupberger, J.; Zeisel, M. B.; Xiao, F.; Thumann, Ch.; Fofana, I.; Zona, L.; Davis, Ch.; Mee, Ch. J.; Turek, M.; Gorke, S.; Royer, C.; Fischer, B.; Zahid, M. N.; Lavillette, D.; Fresquet, J.; Cosset, F.-L.; Rothenberg, S. M.; Pietschmann, T.; Patel, A. H.; Pessaux, P.; Doffoël, M.; Raffelsberger, W.; Poch, O.; McKeating, J. A.; Brino, L.; *et al.* (2011) "EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy" *Nature Medicine*, 17, 589-595.
12. Sulkowski, M. S.; Kang, M.; Matining, R.; Wyles, D.; Johnson, V. A.; Morse, G. D.; Amorosa, V.; Bhattacharya, D.; Coughlin, K.; Wong-Staal, F.; Glesby, M. J.; (2014) "Safety and Antiviral Activity of the HCV Entry Inhibitor ITX5061 in Treatment-Naive HCV-Infected Adults: A Randomized, Double-Blind, Phase 1b Study", *J. Infect. Dis.* 209, 658-667.
13. Ferenci, P.; Bernstein, D.; Lalezari, J.; Cohen, D.; Luo, Y.; Cooper, C.; Tam, E.; Marinho, R. T.; Tsai, N.; Nyberg, A.; Box, T. D.; Younes, Z.; Enayati, P.; Green, S.; Baruch, Y.; Bhandari, B. R.; Caruntu, F. A.; Sepe, T.; Chulanov, V.; Janczewska, E.; Rizzardini, G.; Gervain, J.; Planas, Planas; Moreno, Ch.; Hassanein, T.; Xie, W.; King, M.; Podsadecki, T.; Reddy, K. R.; (2014) "ABT-450/r-Ombitasvir and Dasabuvir with or without Ribavirin for HCV", *New Eng. J. Med.* DOI: 10.1056/NEJMoa1402338.

Development of anti-*Leishmania* vaccines: contribution of Spanish researchers

Carlos Alonso*¹, Manuel Soto¹

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Nicolás Cabrera, 1, Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, Spain

*e-mail: calonso@cbm.uam.es

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 2 (2014), pag. 250-264

ABSTRACT

Several *Leishmania* antigens have been characterized and assayed, as recombinant products, in vaccination trials using different experimental models of leishmaniasis. Vaccination strategies have been developed to induce adequate cellular responses against a great number of antigenic proteins. Spanish groups, working alone or, in many cases, in collaborative research projects have contributed to gather and get an important level of information about families of antigenic protein properties and procedures for immune intervention. Some of these topics are included in the present review.

Keywords: Anti-*Leishmania* vaccines; antigenic proteins; experimental models.

RESUMEN

Desarrollo de vacunas contra Leishmania: contribución de investigadores españoles

Varios antígenos de *Leishmania* han sido caracterizados y probados, como productos recombinantes, en ensayos de vacunación empleando diferentes modelos experimentales de leishmaniosis con objeto de inducir respuestas celulares adecuadas, además, de protección contra la infección. Diferentes grupos de investigación españoles, trabajando solos o, en muchos casos, en proyectos de investigación cooperativos, han contribuido a reunir un importante nivel de conocimiento sobre diferentes familias de proteínas antigénicas y procedimientos de intervención inmunitaria. Algunos de estos temas se discuten en la presente revisión.

Palabras clave: Vacunas contra *Leishmania*; Proteínas antigénicas; Modelos experimentales.

1. INTRODUCTION

Parasites from genus *Leishmania* have a digenetic life cycle in which parasite multiply as extracellular promastigotes in the mid-gut of their insect vectors (sand-flies from genus *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World). Parasites are transmitted to the vertebrate host during blood meal and after infecting macrophages they are transformed in the amastigote forms that replicate in vacuoles of lysosomal origin. Infection of different vertebrate hosts with several species from genus *Leishmania* can cause a complex group of diseases globally termed as leishmaniasis. In humans, depending on the infectious species and the host immune state, the disease ranges in severity from cutaneous (CL; caused by *Leishmania major* in the Old World and *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*, between other species in the New World), diffuse cutaneous (DCL, caused by *Leishmania aethiopica* in the Old World and *L. mexicana* in the New World) to mucocutaneous (MCL, caused mainly by *L. braziliensis*) and visceral leishmaniasis (VL, caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* in the Old World and by *Leishmania chagasi* (genetically identical to *L. infantum* (1)) in the New World (2). These infections are endemic in several tropical and subtropical countries around the world (3) and are responsible for the second-highest number of deaths due to a parasite infection after malaria (4). Canine viscerocutaneous leishmaniasis (VCL) is an important emerging zoonosis in Mediterranean countries, Middle East and Latin America (5). This severe form of the disease is caused by *L. infantum* and by *L. chagasi* in the Old World and in the New World, respectively. Wild canids and domestic dogs act as parasite reservoirs, playing a central role in the transmission to humans (Reviewed in (6). Different spectra of human and canine disease can be developed after infection, from subclinical infection to disseminated infection (2, 7). The outcome of infection is determined by the interactions between the host immune system and different parasite species. Generally, for all forms of leishmaniasis, except MCL, protective immunity is associated with a classical cell mediated immune response that induces macrophage activation by T cells derived cytokines, while non-healing disease is associated with the generation of humoral responses (6-8). In MCL patients an exacerbated and non-controlled inflammatory response seems to be responsible for the pathogenesis (9).

The fact that patients recovered from disease are resistant to reinfection has been taken as an indication that a vaccine is feasible. Different research strategies have been employed for the generation of vaccines against *Leishmania* although there is no vaccine against this parasite in humans. In this context, some vaccines are now at the research phase and one of them, namely Leish-110f and that is based on a three antigen fusion recombinant protein (10) is on the development phase (11). Regarding prophylaxis in dogs, there are three

commercial vaccines against canine leishmaniasis: Leishmune (based on Parasite Fucose-Manose-Ligand) (12), Leishtec, based on a recombinant amastigote antigen namely A2 protein (13) and CaniLeish, composed on promastigotes secreted-excreted factors (14, 15). In spite of the existence of these products, the search of molecules for development of *Leishmania* vaccines continues, looking for improving protection against different forms of leishmaniasis. There are recent review articles covering the progress made towards the development of *Leishmania* vaccines, including some of the most studied parasite proteins together with the effect of various adjuvants employed in experimental vaccination trials (4, 11, 16-22). There is general consensus indicating that the establishment of a protective anti-*Leishmania* response may require the induction of parasite specific long-lasting memory T cells that will expand as effector T cells for the production of IFN-gamma dependent responses specific for parasite antigens in order to activate the leishmanicidal capacities of infected macrophages. In this way, most of the recent research is focused on the identification of the *Leishmania* molecules that interacts with the host immune system and on the analysis of their prophylactic properties when immunized in experimental models of infection as second generation vaccines (based on parasite fractions or recombinant proteins) or third generation vaccines (mainly DNA-based vaccines). In this work we make a review of these studies performed with different parasite proteins, immunodominant antigens during infection, focusing on the results obtained taking into consideration the implication of different Spanish researchers, alone or in collaborative work, in order to show the important efforts made in our country during the last years, helping to mitigate the effects of this emerging disease.

2. LEISHMANIA SURFACE ANTIGENS

A number of surface glycoproteins are present in promastigote forms of *Leishmania* parasites. The *Leishmania* proteinase GP63, one of the most abundant surface-exposed proteins on parasite promastigotes (23, 24) has been described as an immunogenic protein during human VL (25). The GP63 is also an antigenic molecule in canine VL, as described by (26). Using a recombinant version of the *L. infantum* GP63 (LiGP63) as well as some synthetic peptides derived from its aminoacid sequence, Dr. Alonso's laboratory (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM) was able to demonstrate that LiGP63 was recognized by the 100% of the sera from *L. infantum* infected dogs and that the C-terminal domain was the most antigenic region of the protein. On the basis of its surface localization and its antigenicity, second generation vaccines related with GP63 and its immunodominant epitopes have been extensively studied as vaccine candidates using murine models of infection (Revised in (27)). Of special interest is the work published by Cote-Sierra and coworkers (28) with the collaboration of Dr..

Segovia's group (Facultad de Medicina, Universidad de Murcia). In this work they used a recombinant version of the C-terminal domain of the GP63 fused to an immunostimulatory molecule. The main objective was to improve protection derived from this region of the GP63, which contains the host-protective T cell epitopes (29), by its fusion with the lipoprotein OprI from *Pseudomonas aeruginosa*, an inducer of IL-12. The authors demonstrated that the fusion lipoprotein was able to induce GP63 specific Th1 and TNF-alpha mediated responses correlated to robust protection against murine CL due to *L. major* infection in the susceptible BALB/c mice (28). An additional promastigote surface glycoprotein, namely GP46, M2 or PSA has been described in different *Leishmania* species (30, 31). This protein possesses a central core composed by different repeats of leucine rich regions described as most immunodominant region recognized by human and canine VL patients (31).

Another abundant component of the promastigote surface is the Kinetoplastid Membrane Protein 11 (KMP-11) a dominant surface membrane protein associated with the promastigote lipophosphoglycan (LPG). Dr. Alonso's research group in collaboration with different laboratories has been implicated in the characterization of genes encoding the KMP-11 from *L. infantum* (32) and *L. panamensis* (33) as well as in the study of the antigenicity of this protein. The immunogenicity of the KMP-11 has been demonstrated in different hosts. Thus, the sera from human patients suffering from active VL but not individuals with subclinical *L. chagasi* infections, react with the recombinant *L. infantum* KMP-11 protein (34). In addition, patients suffering from MCL or CL showed a KMP-11 specific production of IL-10 (35). Finally, anti-KMP-11 antibodies were found in the sera from VL dogs infected with *L. infantum* (32, 36). Vaccines based on this protein have shown to be protective in different animal models. The protective capacity of the KMP-11 described in a hamster model of VL infected by both pentavalent antimonial sensitive and resistant virulent *L. donovani* strains (37) has been recently reinforced after demonstration that a DNA vaccine based on *L. infantum* KMP-11 was able to protect hamster from infection with *L. chagasi* (38) and a vaccine composition formed by the recombinant *L. infantum* KMP-11 loaded in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles was able to protect mice from CL due to *L. braziliensis* infection (39). Moreover, this last formulation stimulates macrophages for secreting pro-inflammatory cytokines and chemokines and for synthesis of superoxide resulting in intracellular *L. braziliensis* killing (40).

The antigenic nature of two different amastigote specific membrane components has been studied with the implication of different Spanish researchers. P8 antigen, a *Leishmania pifanoi* amastigote specific proteoglycolipid complex, biochemically characterized by Dr. Colmenares in Dr. MacMahon-Pratt's laboratory (41), was able to stimulate the innate immune response of murine

macrophages in a TLR4 dependent manner (42) and also was up-regulating the expression of IFN-gamma and TNF-alpha in asymptomatic *L. infantum* infected dogs (43). The induction of CD4⁺ and CD8⁺ mediated responses by the immunization of the P8 complex combined with the *Propionibacterium acnes* adjuvant in C57BL/6 mice resulted in protection against *L. amazonensis* infection (44). HASPB1, an hydrophilic acylated surface protein, is another component of the amastigote membranes (45, 46). This protein is able to elicit humoral responses in humans infected by *L. donovani* (47). In a canine vaccine trial made in Madrid (Instituto de Salud Carlos III) it was shown that HASPB1 was able to induce protection against experimental infection with *L. infantum* in dogs when administered in combination with a mineral oil based adjuvant (Montanide™ISA 720).

Globally, most of the surface components of the parasite are antigenic during infection in different hosts. Different vaccination trials were performed employing purified fractions (in some cases) and mostly recombinant versions of the antigens, combined with adjuvants that stimulate cellular responses. Depending on the model, the vaccination studies resulted in different degrees of protection, The different degrees of protection was usually correlated with the induction of cellular responses. These results can be taken as an indication that surface proteins should be taken into account for the development of anti-*Leishmania* vaccines. However, and as is indicated below, proteins with intracellular locations are also interacting with the host immune system.

3. LEISHMANIA INTRACELLULAR ANTIGENIC PROTEINS

Many intracellular parasite proteins interact with the host immune system after *Leishmania* infection. Most of them are members of conserved housekeeping proteins like intracellular receptors, heat shock proteins, ribosomal proteins and histones (48). In spite of their conserved nature, the humoral and cellular responses against them are specifically directed against the parasite antigens without showing cross-reactivity with the host counterparts. The specificity of the response is based on the location of their antigenic determinants in the most divergent regions of the parasite proteins (48, 49). Different Spanish scientists have been implicated in the search for this type of related proteins. Some of their results are highlighted below.

3.1. *Leishmania* and its antigenic histones

Leishmania histones, in spite of their nuclear location and their high degree of conservation throughout eukaryotic organisms, have been described as immunodominant antigens during *Leishmania* infection (48). The characterization

of the *L. infantum* histone H2A was made using sera from infected dogs that were recognizing this basic protein (50). The rest of the nucleosome forming histones (H3, H2B and H4) was described as antigens in serologic assays employing canine VCL sera (51, 52). Antigenicity is not only related to the VL canine infection, since the four core histones were also recognized by sera from CL and MCL human patients, being the H2A the most antigenic core histone (53). This protein is also recognized by sera from VL patients infected with *L. chagasi* (34). The antigenicity of the H1 linker histone in patients infected by *L. braziliensis* has been demonstrated by Dr. Valladares research group (Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna) (54, 55). Remarkably, the anti-histone humoral response elicited during infection is specific for the parasite antigens and does not show cross-reactivity with the host histone, since B cell epitopes are mainly located in the most divergent regions of the parasite histones (52, 55-57). The presence of IFN-gamma mediated specific T cell responses has been demonstrated for the H2B protein in human patients of CL and VL (49, 58) and for H2A and H3 in CL patients (59).

The prophylactic value of the *Leishmania* histones was evaluated in different experimental models with the implication of different Spanish researchers. Induction of Th1 responses against the four *L. infantum* nucleosomal histones were able to protect BALB/c mice against a virulent challenge with *L. major* (60, 61), *L. braziliensis* (62) and *L. infantum* (63). Beside data reporting the protective capacities of the H1 histone in murine (64) and monkey (65) models, a vaccine based on this protein was tested with success (62.5% of infected animals without clinical symptoms) in a vaccine trial against experimental canine VL (66).

Taking into account the high degree of immunogenicity of the parasite histones and their value as immuno-prophylactic molecules tools against leishmaniasis in different experimental models, parasite histones emerge as a powerful tool against *Leishmania* infection. In this sense and as it is indicated in section 4, different combination molecules designed as anti-*Leishmania* vaccines include *Leishmania* histone-genes or proteins.

3.2. *Leishmania* ribosomes as vaccines

Leishmania ribosomes have emerged as immunodominant particles during parasite infection. Many ribosomal proteins are recognized by the sera from VL dogs (67-70) or are antigenic in human MCL and VL patients (68, 71). *Leishmania* acidic ribosomal P proteins (namely P0, P2a and P2b) are good examples of *Leishmania* intracellular antigens. Strong humoral responses are elicited against them during infection (mainly in the VL forms of human and canine disease). Interestingly, anti-P antibodies are specifically directed against parasite P proteins without cross-reactivity with the host orthologs (reviewed in (48)) although these proteins are antigenic in patients with autoimmune diseases (72). The location of B

cell epitopes in the most variable region of the P2a, P2b and P0 proteins explains the observed specificity of the response (69, 70). The P0 protein has been employed in different vaccination assays in murine models of CL employing susceptible (BALB/c) and resistant (C57BL/6) mice. BALB/c mice immunization with a parasite P0-based DNA vaccine or with the rP0 protein combined with Th1 inducing oligonucleotides induced partial protection after challenge with *L. major*. Immunized animals showed a delay in the development of cutaneous lesions but mice ultimately developed a non-healing form of the disease (73, 74). On the other hand, the Th1 responses induced by vaccination conferred protection against CL in C57BL/6 mice (74). Since the administration of some other ribosomal constituents using immunization procedures inducing Th1 responses was related to the generation of protective responses (75, 76), vaccines based on total ribosome extract (LRP) were analyzed. In addition, a cDNA clone encoding the *L. braziliensis* ribosomal protein S4 was recognized by a T-cell clone derived from a resistant VL human donor with a positive DTH skin test (49), indicating that the recognition of some of the parasite ribosomal proteins by the host immune system is not necessarily related to disease progression. Administration of the LRP combined with Th1 inducing adjuvants prompted a ribosome-specific Th1 response in mice, correlated with protection against the development of leishmaniasis due to infective challenges with *L. major* (77), *L. amazonensis* or *L. chagasi* (78) parasites. The robust protection observed in the susceptible model BALB/c-*L. major* (detected by the absence of cutaneous lesions for long periods of time) was accompanied by the capacity to resist a secondary infection (79). Two new antigenic ribosomal molecules obtained as recombinant proteins by the expression of the *L. major* encoding LmL3 and LmL5 genes have shown immuno-prophylactic properties against infection with *L. major* and *L. braziliensis* in BALB/c mice.

3.3. *Leishmania* homolog of mammalian receptor for activated C kinase (LACK)

LACK protein is one of the most studied *Leishmania* antigens. This intracellular protein is a member of the tryptophan-aspartic acid repeat family of proteins and it has been implicated in the induction of early IL-4 responses after *L. major* infection (80). In this sense, BALB/c rendered tolerant to LACK, as a result of transgenic expression of this molecule in the thymus, were resistant to infection with *L. major* and develop a Th1 response after infection (81). Several vaccination protocols were tested in collaboration between Dr. Esteban (Centro Nacional de Biotecnología) and Dr. Larraga (Centro de Investigaciones Biológicas) research groups using different LACK preparations, based on the *L. infantum* LACK protein, that was characterized in Dr. Larraga's research group (82). The main strategy was the induction of robust cellular responses against LACK by the use of Th1 inducing procedures (mainly DNA vaccines (83-85)) alone or combined with recombinant Vaccinia virus expressing LACK using a prime-boost strategy (86-94). Using these

strategies involving the LACK molecule of *L. infantum*, cross-protective responses were found in murine models of CL due to *L. major* (83, 87, 88, 90, 93, 94) or *L. amazonensis* (84) infections. The *L. infantum* LACK based vaccines also protect mice against murine VL disease caused by *L. infantum*/*L. chagasi* (85, 86, 91). Recent studies have correlated the observed protection to the induction of effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing IFN-gamma and TNF-alpha in response to the LACK antigen (92). These vaccination trials were extended to the experimental model of canine leishmaniasis (89, 95). Prime-boost vaccination resulted in the induction of Th1-like specific for the LACK antigen, correlated with the induction of protective responses in the vaccinated groups: lower parasite load and humoral responses against parasite proteins, as well as less external clinical symptoms (89).

4. CONCLUDING REMARKS

Different candidates for the development of *Leishmania* vaccines have emerged from the studies described in this review. As a brief summary, vaccines against *Leishmania* may depend on the selection of the adequate parasite proteins but also on the development of immunization strategies inducing memory T cellular responses able to mount a fast but controlled Th1 response when parasite is inoculated by the insect vector. Combination of parasite surface exposed structures and intracellular antigens emerge as an interesting poly-epitope based strategy that should control the replication of different *Leishmania* species. Different poly-antigenic fusion molecules have been designed for development of *Leishmania* vaccines (10, 96). Among them, the Q protein developed and tested in collaboration between different Spanish groups, is formed by the fusion of two antigenic regions of the H2A beside the antigenic domains of the three P ribosomal antigens (P2a, P2b and P0). This protein was able to confer protection to mice (97) and dogs (98) when combined with BCG as adjuvant. In addition, the Q-protein was able to induce protection when administered in dogs without any adjuvant (99). This protection was demonstrated by Dr. Gomez-Nieto group using a model of experimental infection that reproduced the course of canine natural infection (100).

Some authors have pointed out that the induction of such complex immune responses as well as the maintenance of the effector memory T cells would require parasite chronicity (reviewed in (101, 102)). In this sense, a mutant *L. infantum* parasite strain with a limited capacity of multiplication within the vertebrate host by the deletion of part of the *hsp70* genes has been constructed in Dr. Requena's laboratory (CBMSO, UAM-CSIC). As the authors point out this mutant strain may emerge as an interesting alternative to antigen-based formulations for creating anti-*Leishmania* vaccines (103, 104)

ACKNOWLEDGEMENTS

This review gathers data from already published paper. It was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación FIS PI11/00095 and from the Instituto de Salud Carlos III within the Network of Tropical Diseases Research (VI P I+D+I 2008-2011, ISCIII -Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa (RD12/0018/0009)). Funding from Laboratorios Leti and an institutional grant from Fundación Ramón Areces are also acknowledged.

REFERENCES

- 1 Mauricio, I. L.; Stothard, J. R.; Miles, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* **16**, 188-189 (2000).
- 2 Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G. Advances in Leishmaniasis. *Lancet* **366**, 1561-1577 (2005).
- 3 Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. *Lancet* **354**, 1191-1199 (1999).
- 4 Mutiso, J. M.; Macharia, J. C.; Kiiro, M. N.; Ichagichu, J. M.; Rikoi, H.; Gicheru, M. M. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. *Journal of Biomedical Research* **27**, 85-102 (2013).
- 5 Gramiccia, M.; Gradoni, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal of Parasitology* **35**, 1169-1180 (2005).
- 6 Reis, A. B.; Giunchetti, R. C.; Carrillo, E.; Martins-Filho, O. A.; Moreno, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology* **26**, 341-349 (2010).
- 7 Baneth, G.; Koutinas, A. F.; Solano-Gallego, L.; Bourdeau, P.; Ferrer, L. Canine leishmaniasis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* **24**, 324-330 (2008).
- 8 Murray, H. W. Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* **175**, 1477-1479 (1997).
- 9 de Oliveira, C. I.; Brodskyn, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Frontiers in Immunology* **3**, 145 (2012).
- 10 Bertholet, S.; Goto, Y.; Carter, L.; Bhatia, A.; Howard, R. F.; Carter, D.; Coler, R. N.; Vedvick, T. S.; Reed, S. G. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine* **27**, 7036-7045 (2009).
- 11 Beaumier, C. M.; Gillespie, P. M.; Hotez, P. J.; Bottazzi, M. E. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Translational Research* **162**, 144-155 (2013).
- 12 Dantas-Torres, F. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Veterinary Parasitology* **141**, 1-8 (2006).
- 13 Fernandes, A. P.; Coelho, E. A.; Machado-Coelho, G. L.; Grimaldi, G., Jr.; Gazzinelli, R. T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Current Opinion in Microbiology* **15**, 476-485 (2012).
- 14 Bongiorno, G.; Paparcone, R.; Manzillo, V. F.; Oliva, G.; Cuisinier, A. M.; Gradoni, L. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs-A preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary Parasitology* **97** 691-695 (2013).
- 15 Moreno, J.; Vouldoukis, I.; Martin, V.; McGahie, D.; Cuisinier, A. M.; Gueguen, S. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1683 (2012)
- 16 Melby, P. C.; Yang, Y. Z.; Cheng, J.; Zhao, W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity* **66**, 18-27 (1998).
- 17 de Oliveira, C. I.; Nascimento, I. P.; Barral, A.; Soto, M.; Barral-Netto, M. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. *Parasitology International* **58**, 319-324 (2009).

- 18 Duthie, M. S.; Raman, V. S.; Piazza, F. M.; Reed, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine* **30**, 134-141 (2012).
- 19 Singh, B.; Sundar, S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* **30**, 3834-3842 (2012).
- 20 Raman, V. S.; Duthie, M. S.; Fox, C. B.; Matlashewski, G.; Reed, S. G. Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application. *Frontiers in Immunology* **3**, 144 (2012).
- 21 Kedzierski, L. Leishmaniasis. *Human Vaccines* **7**, 1204-1214 (2011).
- 22 Okwor, I.; Mou, Z.; Liu, D.; Uzonna, J. Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* **3**, 128 (2012).
- 23 McConville, M. J.; Blackwell, J. M. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 15170-15179 (1991).
- 24 Pimenta, P. F.; Saraiva, E. M.; Sacks, D. L. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology* **72**, 191-204 (1991).
- 25 Shreffler, W. G.; Burns, J. M. Jr.; Badaro, R.; Ghalib, H. W.; Button, L. L.; McMaster, W. R.; Reed, S. G. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *The Journal of Infectious Diseases* **167**, 426-430 (1993).
- 26 Morales, G.; Carrillo, G.; Requena, J. M.; Guzman, F.; Gomez, L. C.; Patarroyo, M. E.; Alonso, C. Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology* **114**, 507-516 (1997).
- 27 Soto, M.; Ramirez, L.; Pineda, M. A.; Gonzalez, V. M.; Entringer, P. F.; Indiani de Oliveira, C.; Nascimento, I. P.; Souza, A. P.; Corvo, L.; Alonso, C.; Brodskyn, C.; Barral, A.; Barral-Netto, M.; Iborra, S. Searching genes encoding *Leishmania* antigens for diagnosis and protection. *Scholarly Research Exchange* **2009**, ID 173039 (2009).
- 28 Cote-Sierra, J.; Bredan, A.; Toldos, C. M.; Stijlemans, B.; Brys, L.; Cornelis, P.; Segovia, M.; de Baetselier, P.; Revets, H. Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against *Leishmania major*. *Infection and Immunity* **70**, 240-248 (2002).
- 29 Yang, D. M.; Rogers, M. V.; Liew, F. Y. Identification and characterization of host-protective T-cell epitopes of a major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major*. *Immunology* **72**, 3-9 (1991).
- 30 Rivas, L.; Kahl, L.; Manson, K.; McMahon-Pratt, D. Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **47**, 235-243 (1991).
- 31 Boceta, C.; Alonso, C.; Jimenez-Ruiz, A. Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* **22**, 55-62 (2000).
- 32 Berberich, C.; Requena, J. M.; Alonso, C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Experimental Parasitology* **85**, 105-108 (1997).
- 33 Ramirez, J. R.; Berberich, C.; Jaramillo, A.; Alonso, C.; Velez, I. V. Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **93**, 247-254 (1998).
- 34 Passos, S.; Carvalho, L. P.; Orge, G.; Jeronimo, S. M.; Bezerra, G.; Soto, M.; Alonso, C.; Carvalho, E. M. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **12**, 1164-1167 (2005).
- 35 Carvalho, L. P.; Passos, S.; Dutra, W. O.; Soto, M.; Alonso, C.; Gollob, K. J.; Carvalho, E. M.; Ribeiro de Jesus, A. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scandinavian Journal of Immunology* **61**, 337-342 (2005).
- 36 Carrillo, E.; Crusat, M.; Nieto, J.; Chicharro, C.; Thomas M, C.; Martinez, E.; Valladares, B.; Cañavate, C.; Requena, J. M.; Lopez, M. C.; Alvar, J.; Moreno, J. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* **26**, 1902-1911 (2008).
- 37 Basu, R.; Bhaumik, S.; Basu, J. M.; Naskar, K.; De, T.; Roy, S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent

- antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* **174**, 7160-7171 (2005).
- 38 da Silva, R. A.; Tavares, N. M.; Costa, D.; Pitombo, M.; Barbosa, L.; Fukutani, K.; Miranda, J. C.; de Oliveira, C. I.; Valenzuela, J. G.; Barral, A.; Soto, M.; Barral-Netto, M.; Brodskyn, C. DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *Acta Tropica* **120**, 185-190 (2011).
- 39 Santos, D. M.; Carneiro, M. W.; de Moura, T. R.; Fukutani, K.; Clarencio, J.; Soto, M.; Espuelas, S.; Brodskyn, C.; Barral, A.; Barral-Netto, M.; de Oliveira, C. I. Towards development of novel immunization strategies against leishmaniasis using PLGA nanoparticles loaded with kinetoplastid membrane protein-11. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 2115-2127 (2012).
- 40 Santos, D. M.; Carneiro, M. W.; de Moura, T. R.; Soto, M.; Luz, N. F.; Prates, D. B.; Irache, J. M.; Brodskyn, C.; Barral, A.; Barral-Netto, M.; Espuelas, S.; Borges, V. M.; de Oliveira, C. I. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of *Leishmania*. *Nanomedicine* **9**, 985-995 (2013).
- 41 Colmenares, M.; Tiemeyer, M.; Kima, P.; McMahon-Pratt, D. Biochemical and biological characterization of the protective *Leishmania pifanoi* amastigote antigen P-8. *Infection and Immunity* **69**, 6776-6784 (2001).
- 42 Whitaker, S. M.; Colmenares, M.; Pestana, K. G.; McMahon-Pratt, D. *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. *Infection and Immunity* **76**, 2149-2156 (2008).
- 43 Carrillo, E.; Ahmed, S.; Goldsmith-Pestana, K.; Nieto, J.; Osorio, Y.; Travi, B.; Moreno, J.; McMahon-Pratt, D. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* **25**, 1534-1543 (2007).
- 44 Colmenares, M.; Kima, P. E.; Samoff, E.; Soong, L.; McMahon-Pratt, D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infection and Immunity*. **71**, 3172-3182 (2003).
- 45 McKean, P. G.; Delahay, R.; Pimenta, P. F.; Smith, D. F. Characterisation of a second protein encoded by the differentially regulated LmcDNA16 gene family of *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **85**, 221-231(1997).
- 46 Flinn, H. M.; Rangarajan, D.; Smith, D. F. Expression of a hydrophilic surface protein in infective stages of *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **65**, 259-270 (1994).
- 47 Jensen, A. T.; Gasim, S.; Moller, T.; Ismail, A.; Gaafar, A.; Kemp, M.; el Hassan, A. M.; Kharazmi, A.; Alce, T. M.; Smith, D. F.; Theander, T. G. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **93**, 157-160 (1999).
- 48 Requena, J. M.; Alonso, C.; Soto, M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitology Today* **16**, 246-250 (2000).
- 49 Probst, P.; Stromberg, E.; Ghalib, H. W.; Mozel, M.; Badaro, R.; Reed, S. G.; Webb, J. R. Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. *Journal of Immunology* **166**, 498-505 (2001).
- 50 Soto, M.; Requena, J. M.; Gomez, L. C.; Navarrete, I.; Alonso, C. Molecular characterization of a *Leishmania donovani infantum* antigen identified as histone H2A. *European Journal of Biochemistry* **205**, 211-216 (1992).
- 51 Soto, M.; Requena, J. M.; Morales, G.; Alonso, C. The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent N-terminal domain. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1219**, 533-535 (1994).
- 52 Soto, M.; Requena, J. M.; Quijada, L.; Perez, M. J.; Nieto, C. G.; Guzman, F.; Patarroyo, M. E.; Alonso, C. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* **115**, 342-349 (1999).
- 53 Souza, A. P.; Soto, M.; Costa, J. M.; Boaventura, V. S.; de Oliveira, C. I.; Cristal, J. R.; Barral-Netto, M.; Barral, A. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PLoS One* **8**, e66110 (2013).

- 54 Carmelo, E.; Zurita, A. I.; Martinez, E.; Valladares, B. The sera from individuals suffering from cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* present antibodies against parasitic conserved proteins, but not their human counterparts. *Parasite* **13**, 231-236 (2006).
- 55 Carmelo, E.; Martinez, E.; Gonzalez, A. C.; Pinero, J. E.; Patarroyo, M. E.; Del Castillo, A.; Valladares, B. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* histone H1 during cutaneous leishmaniasis: localization of antigenic determinants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9**, 808-811(2002).
- 56 Soto, M.; Requena, J. M.; Quijada, L.; Garcia, M.; Guzman, F.; Patarroyo, M. E.; Alonso, C. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunology Letters* **48**, 209-214 (1995).
- 57 Soto, M.; Requena, J. M.; Quijada, L.; Gomez, L. C.; Guzman, F.; Patarroyo, M. E.; Alonso, C. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* **106**, 454-461(1996).
- 58 Meddeb-Garnaoui, A.; Toumi, A.; Ghelis, H.; Mahjoub, M.; Louzir, H.; Chenik, M. Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively. *Vaccine* **28**, 1881-1886 (2010).
- 59 de Carvalho, L. P.; Soto, M.; Jeronimo, S.; Dondji, B.; Bacellar, O.; Luz, V.; Orge, G.; Alonso, C.; Jesus, A. R.; Carvalho, E. M. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes and Infection* **5**, 7-12 (2003).
- 60 Iborra, S.; Soto, M.; Carrion, J.; Alonso, C.; Requena, J. M. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **22**, 3865-3876 (2004).
- 61 Carrion, J.; Nieto, A.; Soto, M.; Alonso, C. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Microbes and Infection* **9**, 735-743 (2007).
- 62 Carneiro, M. W.; Santos, D. M.; Fukutani, K. F.; Clarencio, J.; Miranda, J. C.; Brodskyn, C.; Barral, A.; Barral-Netto, M.; Soto, M.; de Oliveira, C. I. Vaccination with *L. infantum chagasi* nucleosomal histones confers protection against new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS One*, **7**, e52296 (2012).
- 63 Carrion, J.; Figueira, C.; Alonso, C. Immunization strategies against visceral leishmaniasis with the nucleosomal histones of *Leishmania infantum* encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells. *Vaccine* **26**, 2537-44 (2008).
- 64 Solioz, N.; Blum-Tirouvanziam, U.; Jacquet, R.; Rafati, S.; Corradin, G.; Mauel, J.; Fasel, N. The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **18**, 850-859 (1999).
- 65 Masina, S.; Gicheru, M. M.; Demotz, S. O.; Fasel, N. J. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen. *The Journal of Infectious Diseases*, **188**, 1250-1257 (2003).
- 66 Moreno, J.; Nieto, J.; Masina, S.; Cañavate, C.; Cruz, I.; Chicharro, C.; Carrillo, E.; Napp, S.; Raymond, C.; Kaye, P. M.; Smith, D. F.; Fasel, N.; Alvar, J. Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* **25**, 5290-5300 (2007).
- 67 Coelho, E. A.; Ramirez, L.; Costa, M. A.; Coelho, V. T.; Martins, V. T.; Chavez-Fumagalli, M. A.; Oliveira, D. M.; Tavares, C. A.; Bonay, P.; Nieto, C. G.; Abanades, D. R.; Alonso, C.; Soto, M. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. *Clinical and Vaccine Immunology* **16**, 1774-1780 (2009).
- 68 Ramirez, L.; Santos, D. M.; Souza, A. P.; Coelho, E. A.; Barral, A.; Alonso, C.; Escutia, M. R.; Bonay, P.; de Oliveira, C. I.; Soto, M. Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the *Leishmania major* recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **31**, 1312-1319 (2013).
- 69 Soto, M.; Requena, J. M.; Quijada, L.; Angel, S. O.; Gomez, L. C.; Guzman, F.; Patarroyo, M. E.; Alonso, C. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clinical and Experimental Immunology* **100**, 246-252 (1995).

- 70 Soto, M.; Requena, J. M.; Quijada, L.; Guzman, F.; Patarroyo, M. E.; Alonso, C. Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunology Letters* **48**, 23-28(1995).
- 71 Soto, M.; Requena, J. M.; Quijada, L.; Alonso, C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **3**, 387-391 (1996).
- 72 Elkon, K.; Skelly, S.; Parnassa, A.; Moller, W.; Danho, W.; Weissbach, H.; Brot, N. Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy Sciences U.S.A* **83**, 7419-7423 (1986).
- 73 Iborra, S.; Soto, M.; Carrion, J.; Nieto, A.; Fernandez, E.; Alonso, C.; Requena, J. M. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity*. **71**, 6562-6572 (2003).
- 74 Iborra, S.; Carrion, J.; Anderson, C.; Alonso, C.; Sacks, D.; Soto, M. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infection and Immunity* **73**, 5842-5852 (2005).
- 75 Melby, P. C.; Ogden, G. B.; Flores, H. A.; Zhao, W.; Geldmacher, C.; Biediger, N. M.; Ahuja, S. K.; Uranga, J.; Melendez, M. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infection and Immunity* **68**, 5595-5602 (2000).
- 76 Stober, C. B.; Lange, U. G.; Roberts, M. T.; Gilmartin, B.; Francis, R.; Almeida, R.; Peacock, C. S.; McCann, S.; Blackwell, J. M. From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. *Vaccine*. **24**, 2602-2616 (2006).
- 77 Iborra, S.; Parody, N.; Abanades, D. R.; Bonay, P.; Prates, D.; Novais, F. O.; Barral-Netto, M.; Alonso, C.; Soto, M. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes Infection* **10**, 1133-1141 (2008).
- 78 Chavez-Fumagalli, M. A.; Costa, M. A.; Oliveira, D. M.; Ramirez, L.; Costa, L. E.; Duarte, M. C.; Martins, V. T.; Oliveira, J. S.; Olortegi, C. C.; Bonay, P.; Alonso, C.; Tavares, C. A.; Soto, M.; Coelho, E. A. Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. *Microbes and Infection* **12**, 967-977 (2010).
- 79 Ramirez, L.; Iborra, S.; Cortes, J.; Bonay, P.; Alonso, C.; Barral-Netto, M.; Soto, M. BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* **2010**, 181690 (2010).
- 80 Launois, P.; Maillard, I.; Pingel, S.; Swihart, K. G.; Xenarios, I.; Acha-Orbea, H.; Diggelmann, H.; Locksley, R. M.; MacDonald, H. R.; Louis, J. A. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* **6**, 541-549 (1997).
- 81 Julia, V.; Rassoulzadegan, M.; Glaichenhaus, N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* **274**, 421-423 (1996)
- 82 Gonzalez-Aseguinolaza, G.; Taladriz, S.; Marquet, A.; Larraga, V. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *European Journal of Biochemistry* **259**, 909-916 (1999).
- 83 Lopez-Fuertes, L.; Perez-Jimenez, E.; Vila-Coro, A. J.; Sack, F.; Moreno, S.; Konig, S. A.; Junghans, C.; Wittig, B.; Timon, M.; Esteban, M. DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against *Leishmania major* infection in mice. *Vaccine* **21**, 247-257 (2002).
- 84 Pinto, E. F.; Pinheiro, R. O.; Rayol, A.; Larraga, V.; Rossi-Bergmann, B. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infection and Immunity* **72**, 4521-4527 (2004).
- 85 Gomes, D. C.; Pinto, E. F.; de Melo, L. D.; Lima, W. P.; Larraga, V.; Lopes, U. G.; Rossi-Bergmann, B. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to

- protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine* **25**, 2168-2172 (2007).
- 86 Dondji, B.; Perez-Jimenez, E.; Goldsmith-Pestana, K.; Esteban, M.; McMahon-Pratt, D. Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* **73**, 5286-5289 (2005).
- 87 Gonzalo, R. M.; Rodriguez, J. R.; Rodriguez, D.; Gonzalez-Aseguinolaza, G.; Larraga, V.; Esteban, M. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes and Infection* **3**, 701-711 (2001).
- 88 Gonzalo, R. M.; del Real, G.; Rodriguez, J. R.; Rodriguez, D.; Heljasvaara, R.; Lucas, P.; Larraga, V.; Esteban, M. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **20**, 1226-1231 (2002).
- 89 Ramos, I.; Alonso, A.; Marcen, J. M.; Peris, A.; Castillo, J. A.; Colmenares, M.; Larraga, V. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* **26**, 333-344 (2008).
- 90 Dondji, B.; Deak, E.; Goldsmith-Pestana, K.; Perez-Jimenez, E.; Esteban, M.; Miyake, S.; Yamamura, T.; McMahon-Pratt, D. Intradermal NKT cell activation during DNA priming in heterologous prime-boost vaccination enhances T cell responses and protection against *Leishmania*. *European Journal of Immunology* **38**, 706-719 (2008).
- 91 Ramos, I.; Alonso, A.; Peris, A.; Marcen, J. M.; Abengozar, M. A.; Alcolea, P. J.; Castillo, J. A.; Larraga, V. Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection. *Vaccine* **27**, 6695-6703 (2009).
- 92 Sanchez-Sampedro, L.; Gomez, C. E.; Mejias-Perez, E.; Sorzano, C. O.; Esteban, M. High quality long-term CD4+ and CD8+ effector memory populations stimulated by DNA-LACK/MVA-LACK regimen in *Leishmania major* BALB/c model of infection. *PLoS One*. **7**, e38859 (2012).
- 93 Perez-Jimenez, E.; Kochan, G.; Gherardi, M. M.; Esteban, M. MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes and Infection* **8**, 810-822 (2006).
- 94 Tapia, E.; Perez-Jimenez, E.; Lopez-Fuertes, L.; Gonzalo, R.; Gherardi, M. M.; Esteban, M. The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. *Microbes and Infection* **5**, 73-84 (2003).
- 95 Ramiro, M. J.; Zarate, J. J.; Hanke, T.; Rodriguez, D.; Rodriguez, J. R.; Esteban, M.; Lucientes, J.; Castillo, J. A.; Larraga, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* **21**, 2474-2484 (2003).
- 96 Dominguez-Bernal, G.; Horcajo, P.; Orden, J. A.; De La Fuente, R.; Herrero-Gil, A.; Ordonez-Gutierrez, L.; Carrion, J. Mitigating an undesirable immune response of inherent susceptibility to cutaneous leishmaniasis in a mouse model: the role of the pathoantigenic HISA70 DNA vaccine. *Veterinary Research* **43**, 59 (2012).
- 97 Parody, N.; Soto, M.; Requena, J. M.; Alonso, C. Adjuvant guided polarization of the immune humoral response against a protective multicomponent antigenic protein (Q) from *Leishmania infantum*. A CpG + Q mix protects Balb/c mice from infection. *Parasite Immunology* **26**, 283-293 (2004).
- 98 Molano, I.; Alonso, M. G.; Miron, C.; Redondo, E.; Requena, J. M.; Soto, M.; Nieto, C. G.; Alonso, C. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Veterinary Immunology Immunopathology* **92**, 1-13 (2003).
- 99 Carcelen, J.; Iniesta, V.; Fernandez-Cotrino, J.; Serrano, F.; Parejo, J. C.; Corraliza, I.; Gallardo-Soler, A.; Marañon, F.; Soto, M.; Alonso, C.; Gomez-Nieto, C. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*. **27**, 5964-5973 (2009).

- 100 Fernandez-Cotrina, J.; Iniesta, V.; Belinchon-Lorenzo, S.; Munoz-Madrid, R.; Serrano, F.; Parejo, J. C.; Gomez-Gordo, L.; Soto, M.; Alonso, C.; Gomez-Nieto, L. C. Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* **192**, 118-128 (2013).
- 101 Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Review Microbiology* **9**, 604-615 (2011).
- 102 Beattie, L.; Evans, K. J.; Kaye, P. M.; Smith, D. F. Transgenic *Leishmania* and the immune response to infection. *Parasite Immunology* **30**, 255-266 (2008).
- 103 Carrion, J.; Folgueira, C.; Soto, M.; Fresno, M.; Requena, J. M. *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. *Parasites & Vectors* **4**, 150 (2011).
- 104 Folgueira, C.; Carrion, J.; Moreno, J.; Saugar, J. M.; Cañavate, C.; Requena, J. M. Effects of the disruption of the HSP70-II gene on the growth, morphology, and virulence of *Leishmania infantum* promastigotes. *International Microbiology* **11**, 81-89 (2008).

Los cocristales farmacéuticos: conceptos generales

Marlene Marcelina Saucedo-Balderas¹, Oscar Zúñiga-Lemus¹, David Ortégón-Reyna², Juan Saulo González-González^{1*}

¹Instituto de Farmacobiología, Universidad de la Cañada, Carretera Teotitlán - San Antonio Nanahuatipán Km 1.7 s/n. Paraje Titlacuatitla. Teotitlán de Flores Magón, Oax. México, C.P. 68540. ²Departamento de Química, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Apartado postal: 14-740, 07000, C.P. 07360 México, D.F., México
e-mail: juan_saulo@unca.edu.mx

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 2 (2014), pag. 265-273.

RESUMEN

Los cocristales farmacéuticos surgen como una posibilidad para mejorar las propiedades biofarmacéuticas y farmacotécnicas de un IFA (Ingrediente Farmacéutico Activo). Los cocristales farmacéuticos son sólidos cristalinos constituidos por un IFA y un formador, los cuales se encuentran en la misma celda cristalina. La búsqueda de nuevos cocristales farmacéuticos es competencia de la química supramolecular, ya que el IFA y el formador se mantienen juntos mediante interacciones no covalentes. Existen métodos en solución y en sólidos para la formación de cocristales. Además, este campo ofrece una posibilidad de desarrollo intelectual debido a la posibilidad de patentar los productos, considerando los parámetros regulatorios. Este trabajo presenta los principales conceptos que se consideran para el estudio de estos sólidos farmacéuticos.

Palabras clave: Química supramolecular; cocristales farmacéuticos; cocrystalización.

ABSTRACT

Pharmaceutical Cocrystals: General concepts.

Pharmaceutical co-crystals emerge as a possibility to improve the biopharmaceutical properties and pharmacotechnical of an Active Pharmaceutical Ingredient (API). The co-crystals are crystalline solids composed of an API and a former, which are located in the same crystal cell. The search for new pharmaceutical co-crystals is the responsibility of supramolecular chemistry, since the former and the API are held together by non-covalent interactions.

Solution and solid state methods are employed for the formation of cocrystals. In addition, this field offers a possibility of intellectual development due to the patentability of products, without neglecting the regulatory aspects. This work presents the main concepts considered for the study of these pharmaceutical solids.

Keywords: Supramolecular chemistry; active pharmaceutical ingredient; cocrystallization.

1. INTRODUCCIÓN

La química supramolecular, o *química entre moléculas*, se encarga del estudio de las interacciones no covalentes presentes entre moléculas diferentes o del mismo tipo, ya sea en estado sólido (empaquetamiento cristalino) o en solución. Estas interacciones se llevan a cabo entre los sitios de reconocimiento de las moléculas (grupos funcionales) y son las responsables de los diferentes arreglos supramoleculares adoptados (1).

El *reconocimiento molecular* es la base de la química supramolecular, ya que la construcción de cualquier sistema supramolecular involucra combinaciones moleculares selectivas. Las moléculas que hacen el reconocimiento se llaman receptores (host) y aquellas que son reconocidas son conocidas como sustratos (guest), por lo tanto, a la química supramolecular a veces se le conoce como *química de receptor-sustrato (host-guest chemistry)* (1).

La ingeniería de cristales se encarga de la aplicación de los conceptos de la química supramolecular al estado sólido, enfatizando la idea de que los sólidos cristalinos son manifestaciones de autoensambles de moléculas. Estas estructuras cristalinas pueden ser consideradas como una serie de eventos moleculares de que involucran un reconocimiento molecular mediante interacciones débiles y direccionales. De esta forma, es competencia de la síntesis supramolecular el diseño y la preparación de este tipo de materiales cristalinos, entre ellos los cocristales (2).

Un cocrystal puede ser definido como un complejo cristalino formado por dos o más especies neutras que se encuentran en la misma celda cristalina y que se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes, principalmente por enlaces de hidrógeno (3).

2. COCRISTALES FARMACÉUTICOS

La capacidad de liberación de un fármaco dentro del paciente en forma eficiente, segura y barata depende en gran medida de las características fisicoquímicas del ingrediente farmacéutico activo (IFA) (4). La mayoría de los

IFA's son sólidos, por lo que se requiere que se encuentren en estado cristalino debido a su facilidad de obtención y a que el proceso de cristalización ayuda a eliminar las impurezas presentes. Tradicionalmente los IFA's en estado cristalino se presentan en forma de sales, solvatos y polimorfos (Figura 1).

Los polimorfos son estructuras cristalinas del mismo compuesto que pueden organizarse al menos de dos formas diferentes; cada polimorfo puede presentar propiedades fisicoquímicas diferentes. Los solvatos e hidratos se forman al quedar atrapadas moléculas del disolvente o de agua dentro de la red cristalina; esto puede representar un problema si durante el periodo de almacenamiento las moléculas de disolvente se liberan de la red cristalina puede afectar la estabilidad de la forma farmacéutica. La formación de sales de los IFA's constituye el principal método para mejorar la solubilidad de los mismos; esto se logra haciendo reaccionar el IFA con un ácido o una base, lo que da como resulta el IFA en forma ionizada (5). En ocasiones estas sales no tienen las propiedades sólidas adecuadas o no pueden formarse debido a la ausencia de grupos ionizables en la estructura química del IFA (6).

Los problemas con el uso de los materiales en estado cristalino son su poca solubilidad y la existencia de más de una forma cristalina de un IFA (polimorfismo). Es aquí donde la ingeniería de cristales ofrece una forma alternativa de presentación de los IFA's en estado cristalino: los cocristales farmacéuticos.

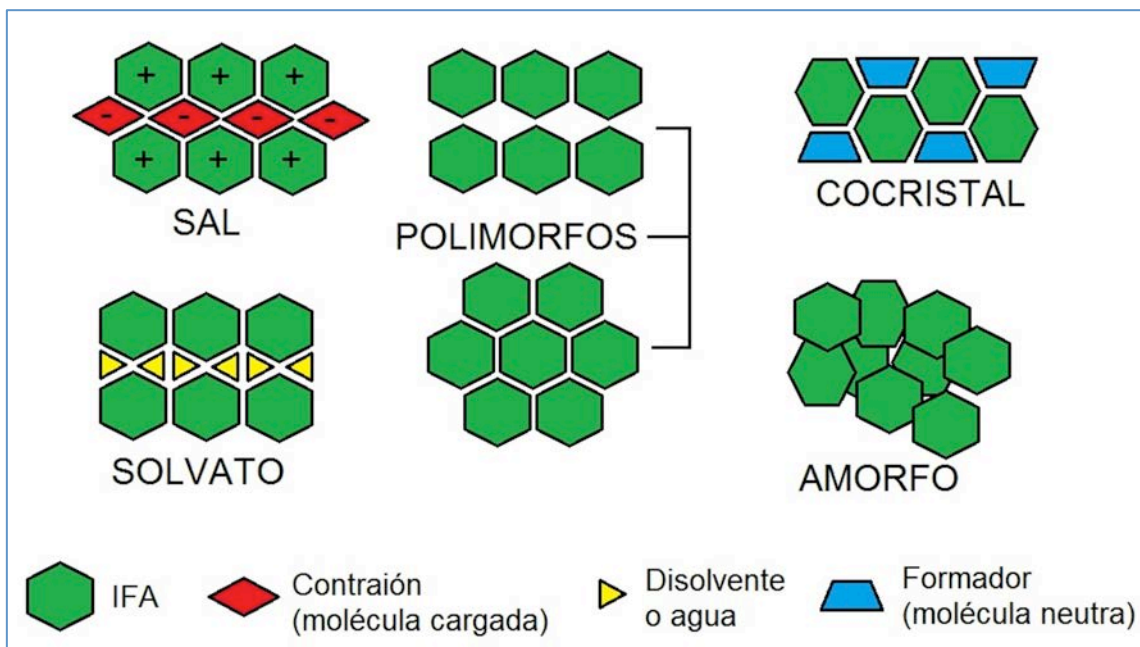


Figura 1.- Sistemas cristalinos de IFA's.

Los cocristales farmacéuticos (Figura 1) son materiales cristalinos constituidos por un IFA y uno o más agentes formadores de cocristales, los cuales son sólidos a temperatura ambiente (7).

Para el diseño de cocrystal farmacéuticos debe tomarse en cuenta los grupos funcionales del IFA que permitan el reconocimiento molecular por parte del agente cocrystalizante. Para esto se utilizan diferentes *sintones supramoleculares*, que son moléculas que contienen grupos funcionales que se complementan con los grupos funcionales del IFA, facilitando el reconocimiento molecular (2). Los agentes formadores de cocrystal farmacéuticos más comunes son: ácidos, amidas, carbohidratos, alcoholes y aminoácidos (8). La Figura 2 muestra algunos de los principales sintones supramoleculares empleados en la formación de cocrystal farmacéuticos.

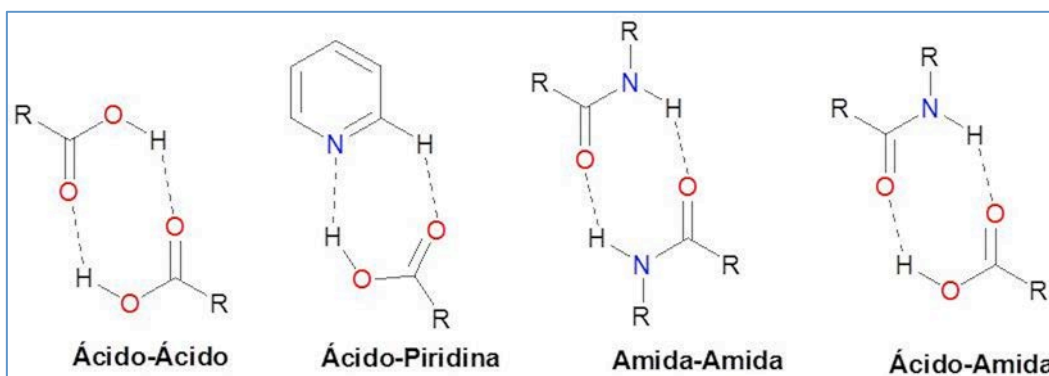


Figura 2.- Sintones supramoleculares empleados en la formación de cocrystal farmacéuticos.

Los cocrystal representan una forma de modificar las propiedades biofarmacéuticas y farmacotécnicas de un IFA, lo que permite obtener nuevos sólidos farmacéuticos con propiedades distintas de solubilidad, velocidad de disolución, estabilidad fisicoquímica, higroscopicidad (7).

3. PREPARACIÓN DE COCRISTALES FARMACÉUTICOS

Los cocrystal farmacéuticos se preparan principalmente por métodos en solución y por métodos en estado sólido.

Los métodos en solución consisten en mezclar cantidades equimolares del IFA y del formador en un disolvente adecuado, con la finalidad de que al evaporarse el disolvente se obtengan los cocrystal.

Los métodos sólidos son una aplicación de la síntesis mecanoquímica (8) y consisten en moler en un mortero o en un molino, cantidades equimolares del IFA y del formador. Una modificación de esta técnica consiste en agregar gotas de algún disolvente al momento de hacer la molienda (9-12).

Otros métodos reportados para la formación de cocrystal farmacéuticos son: la adición de antisolventes (13), cocrystalización asistida por ultrasonido (14), cocrystalización con fluidos supercríticos (15) y cocrystalización por slurryng o suspensión (16).

4. CARACTERIZACIÓN DE COCRISTALES FARMACÉUTICOS

La caracterización estructural de los cocristales se realiza utilizando técnicas como espectrofotometría de infrarrojo (IR), difracción de rayos X de monocristal, difracción de rayos X de polvos y resonancia magnética nuclear. Mientras que la caracterización física se determina el punto de fusión y se utilizan técnicas de calorimetría diferencial de barrido DSC y análisis termogravimétrico (TGA) (17).

La espectrofotometría de IR y Raman permiten identificar desplazamientos en las frecuencias vibracionales de los grupos funcionales involucrados en las interacciones no covalentes encargadas de la formación del cocrystal (18-19).

La difracción de rayos X de monocristal (XRD) es la técnica más utilizada para conocer la estructura molecular de un cocrystal farmacéutico (20-22), sin embargo, como no todos los cocristales forman monocristales, se recurre a la difracción de rayos X de polvos (PXRD), en la cual, se obtienen los difractogramas del IFA y del formador y se comparan con el difractograma del cocrystal en busca de nuevas fases cristalinas (23-25).

La calorimetría diferencial de barrido permite obtener información acerca de los procesos de fusión, obteniendo las temperaturas de transiciones de fase y entalpías de fusión que presentan los cocristales en comparación con el formador y el IFA (26-27).

5. PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS COCRISTALES FARMACÉUTICOS

Al igual que con cualquier otro polvo farmacéutico, es necesario estudiar las propiedades fisicoquímicas de un cocrystal con la finalidad de determinar su posible uso como en una aplicación comercial garantizando la estabilidad seguridad en una forma farmacéutica. Estas propiedades incluyen el punto de fusión, solubilidad, disolución y estabilidad (3).

5.1 Punto de fusión

El punto de fusión es una propiedad física y fundamental de los sólidos que se utiliza para como indicador de pureza y caracterización. Es la temperatura a la cual se encuentran en equilibrio la fase sólida y la fase líquida. Ésta puede ser determinada utilizando un fusiómetro o, preferentemente, la calorimetría diferencial de barrido (DSC), ya que esta última aporta información acerca de la entalpía de fusión del sólido.

Se ha observado que los puntos de fusión de un cocrystal cambian con respecto a los puntos de fusión individuales del IFA y del formador, pudiendo quedar dentro del rango formado por las temperaturas de fusión del IFA o del formador; o por encima o por debajo de dicho rango. Esto debido a los arreglos

moleculares presentes en la celda cristalina del cocrystal que difieren de los arreglos cristalinos en las formas libres del IFA y del formador (17, 26-27).

5.2 Estabilidad

Es una de las pruebas más importantes para evaluar un cocrystal farmacéutico. Las pruebas de estabilidad incluyen. Se realizan diferentes pruebas de estabilidad dependiendo de la estructura y de las características de las moléculas.

Se realizan pruebas de estabilidad acelerada de temperatura y humedad con la finalidad de identificar las mejores condiciones de almacenamiento del producto(28). La cocrystalización de la cafeína con ácidos dicarboxílicos ha permitido solucionar el problema de hidratación que presenta la cafeína (29).

La estabilidad de disolución es la capacidad que tienen los componentes del cocrystal de permanecer en solución y no cristalizar. Esta prueba da indicios acerca de la posible disociación o precipitación de los componentes del cocrystal. En estos estudios se simulan las condiciones de los fluidos gástricos o intestinales con la finalidad de asegurar la solubilidad y la velocidad de disolución (30).

5.3 Solubilidad

La búsqueda en la mejora de la solubilidad de los IFA's (31) es lo que ha conducido al desarrollo de los cocrystal farmacéuticos. En este caso se evalúa, en diferentes medios, el perfil de disolución del IFA en forma libre con el perfil de disolución del IFA en el cocrystal. Se han reportado revisiones en donde se muestran ejemplos acerca de la mejoría en la solubilidad de un IFA en forma de cocrystal con respecto al fármaco libre (32-33).

5.4 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad es la cantidad y velocidad con la que un IFA llega a la circulación sistémica. Uno de los objetivos principales del desarrollo de los cocrystal farmacéuticos es que mediante la formación de un cocrystal, un IFA pueda aumentar su biodisponibilidad. Se llevan a cabo estudios en los que se compara la biodisponibilidad del IFA en forma libre con la del IFA en forma de cocrystal. Algunos fármacos cuya biodisponibilidad aumenta en forma de cocrystal son la quercetina (34), la carbamazepina (35) y la iloperidona (36).

6. COCRISTALES Y PROPIEDAD INTELECTUAL

La formación de cocrystal farmacéuticos ofrece un campo de investigación floreciente con aplicación directa a la industria farmacéutica. Los cocrystal farmacéuticos son patentables si cumplen con los criterios de novedad, utilidad y no obviedad. Como parte de una amplia cartera de patentes en forma sólida, los

cocristales farmacéuticos pueden ofrecer una ventaja comercial distinta respecto de la exclusividad en el mercado (37).

7. MARCO REGULATORIO

La FDA clasifica a los cocristales farmacéuticos como “complejos moleculares disociables IFA-excipientes”, en el que el agente cocrystalizante se considera como un excipiente. Por lo tanto, un IFA que ha sido procesado con un excipiente cocrystalizante debe ser tratado como un producto intermediario farmacéutico.

Para la solicitud de nuevos fármacos que contengan o digan contener cocristales farmacéuticos, se debe tener evidencia que cumpla dos criterios:

-Que el IFA y el excipiente se encuentran en forma neutra y que interactúan de manera no iónica.

-Que la disociación completa entre el excipiente y el IFA ocurre antes de que este último llegue a su sitio de acción farmacológica.

Un cocrystal IFA-excipiente que cumple con estas condiciones se considera como un cocrystal farmacéutico y obtiene la clasificación regulatoria de producto intermedio, el cual no se considera como un nuevo IFA, sino como un intermediario farmacéutico cocrystalino (38).

8. COCRISTALES FARMACÉUTICOS DE INTERÉS

En varias revisiones se muestra que los sistemas cocrystalinos farmacéuticos más estudiados involucran los siguientes IFA's: acetaminofén, acetazolamida, alprazolam, carbamazepina, cafeína, citosina, ibuprofeno, efavirenz, etenzamida, fluconazol, indometacina, isoniazida, lamotrigina, lidocaína, mefloquina, meloxicam, minoxidil, pterostilbeno, nifedipina, piracetam, quinidina, espirolactona, ácido salicílico, teofilina (39-40).

9. CONCLUSIÓN

La búsqueda de nuevos cocristales farmacéuticos es un área con un gran potencial de desarrollo, debido a las mejoras en las propiedades de los IFA's. Para lograr esto se debe poner especial atención en las posibles interacciones no covalentes que puede formar el IFA y elegir el sintón supramolecular adecuado para la formación del cocrystal, así como también la técnica que se empleará para prepararlos. Todo esto permite obtener productos farmacéuticos novedosos que son patentables, sin dejar de lado el aspecto regulatorio.

10. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) por el financiamiento (proyecto 179674) otorgado.

11. REFERENCIAS

1. Steed, J. W.; Atwood, J. L.; *Supramolecular Chemistry*; Second Ed; John Wiley & Sons, Ltd.; UK, 2009; p 27.
2. Almarsson, Ö.; Zaworotko, M. J. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? *Chem. Comm.***7**, 1889-1896 (2004).
3. Schultheiss, N.; Newman, A. Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Cryst. Growth Des.***9**, 2950-2967 (2009).
4. Mirza, S.; Miroshnyk, I.; Heinämäki, J.; Yliruu, J. Co-crystals: An emerging approach for enhancing properties of pharmaceutical solids. *Dosis***24**, 90-96 (2008).
5. Jones, W.; Motherwell, W. D. S.; Trask, A. V. Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement. *MRS Bull.***31**, 875-879 (2006).
6. Sekhon, B. S. Pharmaceutical co-crystals - a review. *ARS Pharm.***50**, 99-117 (2009).
7. Herrera Ruiz, D. ¿Qué sabe Ud. acerca de... los co-cristales farmacéuticos? *Rev. Mex. Cienc. Farm.***41**, 55-56 (2010).
8. Delori, A.; Friscic, T.; Jones, W. The role of mechanochemistry and supramolecular design in the development of pharmaceutical materials. *CrystEngComm***14**, 2350-2362 (2012).
9. Prasad, R. V.; Rakesh, M. G.; Jyotsna, R. M.; Mangesh, S. T.; Anita, P. S.; Mayur, P. K. Pharmaceutical Cocrystallization: A Review. *IJPCS***3**, 725-736 (2012).
10. Friscic, T.; Jones, W. Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding. *Cryst. Growth Des.***9**, 1621-1637 (2009).
11. Weyna, D. R.; Shattock, T.; Vishweshwar, P.; Zaworotko, M. J. Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution. *Cryst. Growth Des.***9**, 1106-1123 (2009).
12. Lin, H.-L.; Wu, T.-K.; Lin, S.-Y. Screening and characterization of cocrystal formation of metaxalone with short-chain dicarboxylic acids induced by solvent-assisted grinding approach. *Thermochim. Acta***575**, 313-321 (2014).
13. Ober, C. A.; Montgomery, S. E.; Gupta, R. B. Formation of itraconazole/L-malic acid cocrystals by gas antisolvent cocrystallization. *Powder Technol.***236**, 122-131 (2013).
14. Aher, S.; Dhumal, R.; Mahadik, K.; Paradkar, A.; York, P. Ultrasound assisted cocrystallization from solution (USSC) containing a non-congruently soluble cocrystal component pair: Caffeine/maleic acid. *Eur. J. of Pharm. Sci.***41**, 597-602 (2010).
15. Padrela, L.; Rodrigues, M. A.; Tiago, J.; Velaga, S. P.; Matos, H. A.; Azevedo, E. G. Tuning physicochemical properties of theophylline by cocrystallization using the supercritical fluid enhanced atomization technique. *J. of Supercritical Fluids***86**, 129-136 (2014).
16. Kojima, T.; Tsutsumi, S.; Yamamoto, K.; Ikeda, Y.; Moriwaki, T. High-throughput cocrystal slurry screening by use of in situ Raman microscopy and multi-well plate. *Int. J. of Pharm.***399**, 52-59 (2010).
17. Nanjwade, V. K.; Manvi, F. V.; Shamrez, A. M.; Nanjwade, B. K.; Maste, M. M. (2011). New Trends in the Co-crystallization of Active Pharmaceutical Ingredients. *J. of Appl. Pharm. Sci.***1**, 1-5.
18. Ali, H. R. H.; Alhalaweh, A.; Mendes, N. F. C.; Ribeiro-Claro, P.; Velaga, S. P. Solid-state vibrational spectroscopic investigation of cocrystals and salt of indomethacin. *CrystEngComm***14**, 6665-6674 (2012).
19. Castro, R. A. E.; Ribeiro, J. D. B.; Maria, T. M. R.; Silva, M. R.; Yuste-Vivas, C.; Canotilho, J.; Eusebio, M. E. S. Naproxen Cocrystals with Pyridinecarboxamide Isomers. *Cryst. Growth Des.***11**, 5396-5404 (2011).
20. Bathori, N. B.; Lemmerer, A.; Venter, G. A.; Bourne, S. A.; Caira, M. R. Pharmaceutical Cocrystals with Isonicotinamide; Vitamin B3, Clofibrac Acid, and Diclofenac-and Two Isonicotinamide Hydrates. *Cryst. Growth Des.***11**, 75-87 (2011).

21. Leyssens, T.; Springuel, G.; Montis, R.; Candoni, N.; Veessler, S. Importance of Solvent Selection for Stoichiometrically Diverse Cocrystal Systems: Caffeine/Maleic Acid 1:1 and 2:1 Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **12**, 1520-1530 (2012).
22. Aitipamula, S.; Chowa, P. S.; Tan, R. B. H. (2009). Theophylline-gentisic acid (1/1). *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **E65**, o2126-o2127.
23. Karki, S.; Fabian, L.; Friscic, T.; Jones, W. Powder X-ray Diffraction as an Emerging Method to Structurally Characterize Organic Solids. *Org. Lett.* **9**, 3133-3136 (2007).
24. Chieng, N.; Hubert, M.; Saville, D.; Rades, T.; Aaltonen, J. Formation Kinetics and Stability of Carbamazepine-Nicotinamide Cocrystals Prepared by Mechanical Activation. *Cryst. Growth Des.* **9**, 2377-2386 (2009).
25. Bucar, D.K.; Henry, R. F.; Lou, X.; Richard W. D.; MacGillivray, L. R.; Zhang, G. G. Z. Cocrystals of Caffeine and Hydroxybenzoic Acids Composed of Multiple Supramolecular Heterosynthons: Screening via Solution-Mediated Phase Transformation and Structural Characterization. *Cryst. Growth Des.* **9**, 1932-1943 (2009).
26. Lu, E.; Rodríguez-Hornedo, N.; Suryanarayanan, R. A rapid thermal method for cocrystal screening. *Cryst Eng Comm.* **10**, 665-668 (2008).
27. Sun, C. C.; Hou, H. Improving Mechanical Properties of Caffeine and Methyl Gallate Crystals by Cocrystallization. *Crystal Growth Des.* **8**, 1575-1579 (2008).
28. International Conference on Harmonization (ICH). ICH Harmonized Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drugs Substances and Products Q1A(R2) (2003). <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html>
29. Trask, A. V.; Motherwell, W. D. S.; Jones, W. Pharmaceutical Cocrystallization: Engineering a Remedy for Caffeine Hydration. *Cryst. Growth Des.* **5**, 1013-1021 (2005).
30. Tomaszewska, I.; Karki, S.; Shur, J.; Price, R.; Fotaki, N. Pharmaceutical characterisation and evaluation of cocrystals: Importance of in vitro dissolution conditions and type of cofomer. *Int. J. Pharm.* **453**, 380-388 (2013).
31. Mohanachandran, P. S.; Sindhumol, P. G.; Kiran, T. S. Enhancement of solubility and dissolution rate: An overview. *Pharm. Globale*, **4**, 1-10 (2010).
32. Thakuria, R.; Delori, A.; Jones, W.; Lipert, M. P.; Roy, L.; Rodríguez-Hornedo, N. Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* **453**, 101-125 (2013).
33. Elder, D. P.; Holm, R.; Diego, H. L. Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility. *Int. J. Pharm.*, **453**, 88-100 (2013).
34. Smith, A. J.; Kavuru, P.; Wojtas, L.; Zaworotko, M. J.; Shytle, R. D. Cocrystals of Quercetin with Improved Solubility and Oral Bioavailability. *Mol. Pharm.* **8**, 1867-1876 (2011).
35. Hickey, M. B.; Peterson, M. L.; Scoppettuolo, L. A.; Morrisette, S. L.; Vetter, A.; Guzmán, H.; Remenar, J. F.; Zhang, Z.; Tawa, M. D.; Haley, S.; Zaworotko, M. J.; Almarsson, O. Performance comparison of a co-crystal of carbamazepine with marketed product. *Eur. J. of Pharm. Biopharm.* **67**, 112-119 (2007).
36. Zhang, T.-T.; Wang, H.-T.; Jia, J.-T.; Cui, X.-Q.; Li, Q.; Zhu, G.-S. Syntheses and pharmacokinetics properties of an iloperidone pharmaceutical cocrystal. *Inorg. Chem. Commun.* **39**, 144-146 (2014).
37. Trask, A. V. An Overview of Pharmaceutical Cocrystals as Intellectual Property. *Mol. Pharm.* **4**, 301-309 (2007).
38. Center for Drug Evaluation and Research. Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals. United States Food and Drug Administration (2013). <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM281764.pdf>
39. Brittain, H. G. Cocrystal Systems of Pharmaceutical Interest: 2011. *Cryst. Growth Des.* **12**, 5823-5832 (2011).
40. Brittain, H. G. Cocrystal Systems of Pharmaceutical Interest: 2010. *Cryst. Growth Des.* **12**, 1046-1054 (2012).

Perfiles de pacientes diabéticos que sufren reacciones adversas a medicamentos. Identificación y caracterización a través de minería de datos

María Isabel Jiménez Serranía^{1*}, Ramona Mateos¹

¹Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno s/n.; 37007 Salamanca

*e-mail: mabel.j.serrania@gmail.com

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 2 (2014), pag. 274-321.

Premio CINFA del Concurso Científico 2013 de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

El análisis estadístico tradicional de las notificaciones de reacciones adversas a medicamentos en pacientes diabéticos ha sido complejo y escaso. Las técnicas de minería de datos –modelo de red de enlaces, modelo de redes de Kohonen- permiten identificar perfiles de pacientes diabéticos tratados con fármacos que sufren reacciones adversas. Son perfiles característicos los trastornos del metabolismo graves no mortales por insulina glargina en mujeres en Cataluña; y los trastornos gastrointestinales no graves por metformina en mujeres de 65-74 años en Aragón. Los pacientes en tratamiento con tres o más agentes orales presentan mayor riesgo de sufrir una reacción adversa.

Palabras clave: Reacción adversa a medicamento; diabetes; minería de datos.

ABSTRACT

Profiles of diabetic patients who suffer adverse drug reactions. Identification and characterization through data mining.

The traditional statistical analysis of notifications of adverse drug reactions in diabetic patients was complex and sparse. The data mining techniques –web graph and Kohonen networks model- allow us to identify drug-treated diabetic patients who suffer adverse reactions. Nonfatal severe metabolic disorders due to insulin glargine in women in Catalonia, and non-serious gastrointestinal metformin disorders in women between 65 and 74 years in Aragon are two characteristics profiles. Patients treated with three or more oral agents are at increased risk of suffering an adverse reaction.

Keywords: Adverse drug reaction, diabetes, data mining.

1. ANTECEDENTES

Las fuentes de datos en farmacovigilancia se generan a partir de estudios específicos sobre una población expuesta, de las historias clínicas o de los sistemas estables de recogida de reacciones adversas (RAs). Estos últimos aglutinan mayor número de reacciones y son de gran utilidad para estudiar los problemas de seguridad de los medicamentos, siendo el Sistema de Notificación Espontánea de Reacciones Adversas a Medicamentos (RAM) el más extendido internacionalmente (1). Las sospechas de RAM son notificadas por los profesionales sanitarios a los Centros Regionales de Farmacovigilancia donde se codifican y evalúan (2).

A partir de las notificaciones espontáneas se generan alertas sobre una posible relación causal entre la administración de un fármaco y la aparición de un determinado acontecimiento adverso, normalmente desconocido o poco documentado (3). Estas alertas son el origen de las hipótesis sobre las que se pueden realizar estudios de farmacovigilancia tales como ensayos clínicos u otros estudios epidemiológicos específicos (2, 4).

A pesar de ello, los estudios sobre notificaciones espontáneas son escasos para algunos grupos de fármacos muy utilizados, como es el caso de los antidiabéticos (5). Sus efectos adversos conocidos aparecen recogidos en la literatura (ver Tabla 1), mientras que otros van apareciendo por nuevas inclusiones o combinaciones.

Existen características conocidas en el perfil de pacientes diabéticos tales como el grupo de edad más numeroso –entre 70 y 80 años- (6), las proporciones de pacientes diabéticos mayores de 80 años -24,2%- y de 40 o menos años -3,5%- (7) o el porcentaje de mujeres diabéticas -52%- (6). A través de notificación espontánea, también se conocen detalles sobre los pacientes que sufren RAM, como que las mujeres presentan con frecuencia más RAM que los hombres (57% vs. 41%) (8), o que Galicia presenta el mayor número de notificaciones en 2005 y Cantabria en 2009 (9). En cambio, no se dispone de perfiles definidos de pacientes diabéticos que sufren RAM.

Para identificar estos perfiles a partir de los registros de sospechas de RAs, los métodos estadísticos tradicionales no son suficientes. Hay que recurrir a las técnicas de minería de datos (*'data mining'*) para manejar de forma eficiente el volumen de información disponible en cada caso (10).

Tabla 1a.- Efectos adversos de los fármacos antidiabéticos presentes en la terapéutica 2000-2008.

EFFECTOS ADVERSOS	INS	BI	SU	I-αG
Alteraciones gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal)	-	x diarrea dosis dependiente, acidez, sabor metálico, pérdida de apetito	x	x flatulencia dosis, dieta y tiempo dependientes; tolerancia
Hipoglucemia	Leve: todas Graves: inhalada>humana rápida>análogos rápida	-	glibenclamida, clorpropamida> glimepirida>gliclazida	terapia combinada
SNC	-	cefaleas	x	x
Aumento de peso	NPH > detemir	-	x	-
Hepatotoxicidad	-	-	Alteración pruebas hepáticas	x
Alteraciones del sistema inmunológico	-	-	Neumonitis	Infecciones urinarias y respiratorias
Alteraciones en el lugar de administración y reacciones cutáneas	Lipohipertrofia localizada, lipoatrofia. Hipersensibilidad. Análogos lenta>humana lenta	-	Rash cutáneo, púrpura, prurito, dermatitis exfoliativa, eritema nodoso, fotosensibilidad.	-
Edema	(insulínico)	-	-	-
Hemáticas	-	Anemia, reducción de absorción de ácido fólico y vit. B12	Anemia hemolítica, agranulocitosis, leucopenia, trombocitopenia	-
Cardiovasculares	-	-	-	-
Musculo-esqueléticas	-	-	-	-
Visuales	-	-	-	-
Pancreatitis aguda	-	-	-	-
Específicas de grupo	Linhalada: tos irritativa remitente, disminución progresiva de función pulmonar, riesgo de cáncer de pulmón en fumadores	Acidosis láctica	Colestasis, hipotiroidismo subclínico transitorio. Hiponatremia, efecto diurético	-

Adaptado de (19-26). INS, insulina; BI, biguanidas; SU, sulfonilureas; I-αG, inhibidores de α-glucosidasas.

Tabla 1b.- Efectos adversos de los fármacos antidiabéticos presentes en la terapéutica 2000-2008 (continuación)

EFFECTOS ADVERSOS	TZD	I-DPP4	GLIN	A-GLP1
Alteraciones gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal)	-	x	x	x
Hipoglucemia	raras ocasiones	-	repaglinida > nateglinida	-
SNC	-	cefaleas	---	cefaleas
Aumento de peso	ligero	-	(con repaglinida)	-
Hepatotoxicidad	x	-	Alteración pruebas hepáticas	-
Alteraciones del sistema inmunológico		Nasofaringitis, rinorrea	Síndrome pseudogripal	x
Alteraciones en el lugar de administración y reacciones cutáneas	-	-	Reacciones de hipersensibilidad cutánea	-
Edema	Retención hidrosalina	x	-	-
Hemáticas	Anemia dilucional leve	-	-	-
Cardiovasculares	Aumento del riesgo de insuficiencia cardíaca. Rosiglitazona: aumento del riesgo de infarto	-	Síndrome coronario	-
Musculo-esqueléticas	Fracturas óseas en mujeres	Mialgias, artralgias	-	-
Visuales	(Pioglitazona: edema macular diabético)	-	x	-
Pancreatitis aguda	-	x	-	x
Específicas de grupo	Hiperlipidemia e hipotrigliceridemia	Pérdida de peso	-	Reacción anafiláctica

Adaptado de (19-26). TZD, tiazolidindionas; I-DPP4, inhibidores de la dipeptidilpeptidasa 4; GLIN, Glinidas; A-GLP1, análogos de GLP-1.

2. OBJETIVO

Identificar perfiles de pacientes diabéticos que sufren reacciones adversas a medicamentos.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Material

Todas aquellas notificaciones espontáneas de sospechas de reacciones adversas donde están registrados fármacos antidiabéticos para el periodo 2000-2008 en España. Según la clasificación Anatómica Terapéutica Química - Anatomical Therapeutic Chemical Classification, ATC- (11), los principios activos de referencia pertenecen al Subgrupo Terapéutico A10 'Fármacos usados en Diabetes' que incluye los subgrupos farmacológicos 'A10A Insulinas y análogos' (Tabla 2) y 'A10B Agentes hipoglucemiantes orales, excluyendo insulinas' -AHOs- (Tabla 3).

Tabla 2.- A10A Insulinas y análogos. Principios activos y código ATC.

Código ATC	Principio activo
A10AB01	I. regular
A10AB04	I. lispro
A10AB05	I. aspart
A10AB06	I. glulisina
A10AC01	I. NPH o isofánica
A10AC01	I. zinc 70%
A10AC04	I. lispro protamina
A10AC30	I. bovina+porcina zinc 70%
A10AD01	I. regular + NPH
A10AD04	I. lispro + lispro protamina
A10AD05	I. aspart + aspart protamina
A10AE01	I. zinc 90%
A10AE04	I. glargina
A10AE05	I. detemir
A10AF01	I. inhalada

Tabla 3.- A10B Agentes hipoglucemiantes, excluyendo insulinas (AHOs). Principios activos y código ATC.

Código ATC	Principio activo
A10BA02	Metformina
A10BA03	Buformina
A10BB01	Glibenclamida
A10BB02	Clorpropamida
A10BB03	Tolbutamida
A10BB07	Glipizida
A10BB08	Gliquidona
A10BB09	Gliclazida
A10BB12	Glimepirida
A10BB00	Glisentida
A10BD03	Metformina y rosiglitazona
A10BD04	Glimepirida y rosiglitazona
A10BD05	Metformina y pioglitazona
A10BD07	Metformina y sitagliptina
A10BD08	Metformina y vildagliptina
A10BF01	Acarbosa
A10BF01	Miglitol
A10BG02	Rosiglitazona
A10BG03	Pioglitazona
A10BH01	Sitagliptina
A10BH02	Vildagliptina
A10BX01	Goma guar*
A10BX02	Repaglinida
A10BX03	Nateglinida
A10BX04	Exenatida

La base de datos FEDRA® 2.0 (Farmacovigilancia Española, Datos de Reacciones Adversas), perteneciente al Sistema Español de Farmacovigilancia de la Agencia Española del Medicamento, contiene la información sobre las RAs detectadas y notificadas por los profesionales sanitarios y por los laboratorios farmacéuticos, tras el inicio de comercialización de medicamentos y productos sanitarios (12).

El material se solicitó en forma de consulta abierta, previo permiso de la Agencia Española del Medicamento (13), y fue facilitado por el Instituto de Farmacoepidemiología de la Universidad de Valladolid en archivos Excel.

Para el tratamiento de la información de sospechas de RAM, hemos respetado los 'Criterios para la utilización de los datos de la Base de Datos FEDRA del Sistema Español de Farmacovigilancia' -SEFV/1/CT- (14) y las 'Normas para la correcta interpretación y utilización de los datos del SEFV' -SEFV/2/CT- (15). A este respecto, hemos tenido en especial consideración que, para cualquier notificación, no hay certeza de que el fármaco sospechoso haya causado la RA comunicada.

PROCESADO DE LA INFORMACIÓN. La fecha de inicio de la reacción (campo obligatorio) es la referencia para la búsqueda.

Cada caso queda identificado por la combinación de las variables 'número de notificación', 'año' y 'Comunidad Autónoma (CC.AA.)' (ya que hay casos donde coinciden los números de notificación y Comunidad). Las operaciones más relevantes realizadas en la base de datos, a efectos de interpretación, han sido: i) codificar la variable continua 'edad' en grupos acordes con los establecidos en la Encuesta Nacional de Salud (ENSE) (16), ii) definir el 5º nivel del código ATC para cada principio activo o producto notificado -3.929 entradas- según la especialidad farmacéutica registrada, y iii) codificar las RAs y las indicaciones terapéuticas de los medicamentos asociados a dichas reacciones según la terminología del diccionario MedDRA (Medical Dictionary for Regulatory Activities)(17, 18). FEDRA® 2.0 emplea la versión en español del diccionario MedDRA (5). Su traducción incluye -manteniendo el orden jerárquico- los términos de bajo nivel (Low Level Term, LtRAM) para la indicación terapéutica; y los términos preferentes (Preferred Term, PtRAM), los términos de alto nivel (High Level Term, HltRAM), y el órgano o sistema correspondiente (System Organ Class, SOC) para la reacción adversa (18, 27). De este modo se codificaron 185 términos de bajo nivel, 380 términos preferentes, 236 términos de alto nivel y 25 órganos o sistemas afectados.

3.1. Método

Cada notificación presenta, al menos, un fármaco antidiabético registrado, pudiendo acompañarse de otros antidiabéticos u otros fármacos diferentes. Por ello, las notificaciones se pre-clasifican según: i) el número de fármacos registrados por notificación en 'notificaciones con un fármaco' (siempre será un antidiabético) y 'notificaciones con varios fármacos' (al menos uno de ellos es antidiabético), y ii) el subgrupo farmacológico: Insulinas, Agentes hipoglucemiantes excluyendo insulinas -AHOs- o combinaciones de Insulinas+AHOs. Se dispone de un total de 1.253 casos, de los que se excluyen 8 casos sin grupos farmacológicos definidos.

En el grupo 'AHO/s y otros fármacos no antidiabéticos' se observa un elevado número de notificaciones que presentan un fármaco no antidiabético en primera posición -orden establecido según el grado de sospecha-. Se realiza una

segunda subdivisión en función de la posición del fármaco antidiabético, resultando las categorías: 'posición 1' y 'otras posiciones'.

La gravedad (mortal, grave, moderada o leve) (4) y la causalidad de las notificaciones (definitiva, probable, posible, condicional, improbable o inclasificable) (2, 28) son examinadas y evaluadas en cada Centro Regional de Farmacovigilancia.

Como se indica en la Figura 1, para cada uno de los grupos definidos se realiza un estudio consistente en la obtención de un Gráfico de red (Análisis de red de enlaces) y un Análisis de perfiles de pacientes diabéticos (Modelo de segmentación).

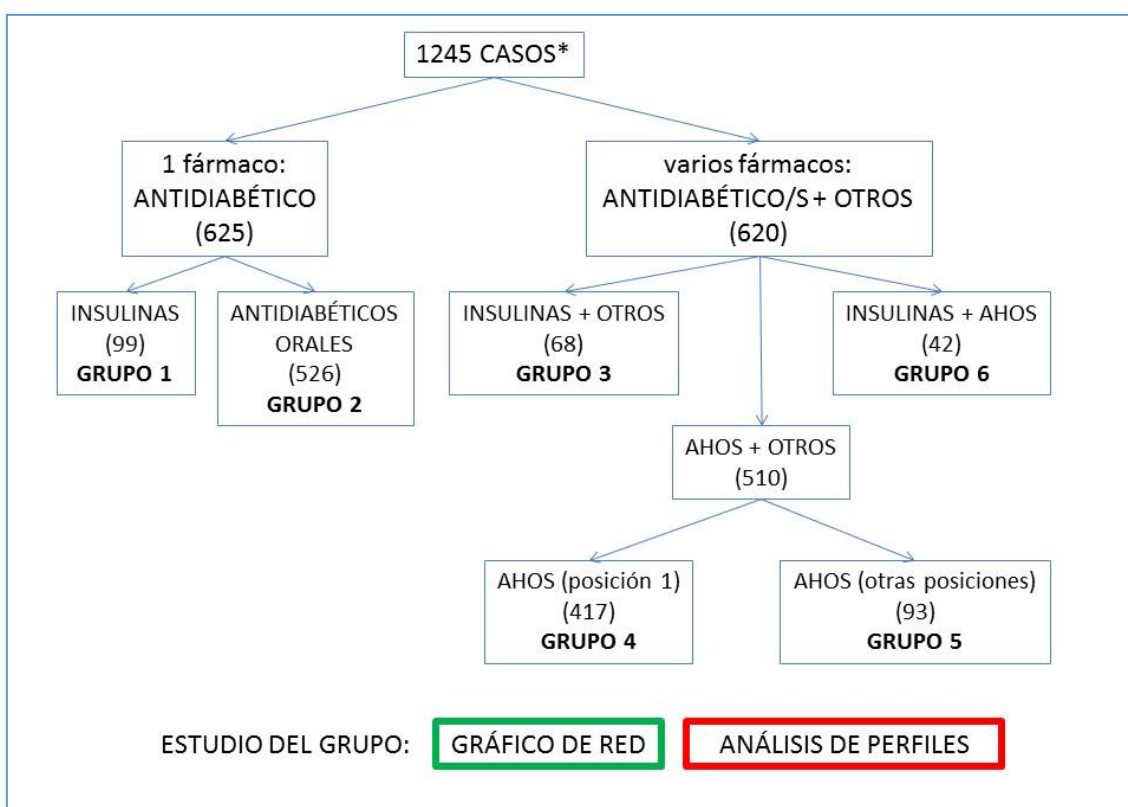


Figura 1.- Clasificación de notificaciones espontáneas de RAM en pacientes diabéticos, según el/los fármaco/s antidiabético/s registrados. * con subgrupo farmacológico definido. () número de notificaciones incluidas en el grupo.

ANÁLISIS DE RED DE ENLACES. Ofrece una imagen previa de las situaciones más frecuentes y características de cada grupo de pacientes diabéticos. Este análisis explora la frecuencia de asociación entre objetos de diferentes tipos. Una de sus aplicaciones más conocidas es la evaluación de los efectos adversos de los medicamentos en su etapa de vigilancia post-comercialización, permitiendo determinar si un efecto adverso particular puede 'enlazarse' (o correlacionarse) con uno o con varios medicamentos (29). Se visualiza mediante un resumen gráfico de frecuencias de co-ocurrencia o Gráfico de red entre valores de dos o más

variables categóricas, donde las líneas más gruesas indican que los términos enlazados están fuertemente relacionados (30). Las variables incluidas en este análisis son los principios activos sospechosos (o sospechosos por interacción) y las reacciones adversas (términos preferentes de RAM -MedDRA-), respetando el orden de notificación de mayor a menor sospecha y gravedad respectivamente. Las frecuencias de correlación más altas también se extraen en tablas (ver Apéndice).

En los casos de monoterapia exploramos las correlaciones entre el principio activo sospechoso -'PRINCIPIO ACTIVO'- y la reacción adversa de mayor gravedad -'reacción adversa (término Preferente MedDRA), posición 1'-. En los casos de politerapia, debido a una mayor incidencia de RAM con el aumento de los fármacos administrados, se exploran las correlaciones entre los dos principios activos más sospechosos -'PRINCIPIO ACTIVO, POSICIÓN 1' y 'PRINCIPIO ACTIVO, POSICIÓN 2'- y las dos reacciones adversas de mayor gravedad -'reacción adversa (Término Preferente MedDRA), posición 1' y 'reacción adversa (Término Preferente MedDRA), posición 2'-.

MODELOS DE SEGMENTACIÓN. Permiten identificar registros similares y clasificarlos según el grupo al que pertenecen. Este procedimiento se realiza sin ningún conocimiento previo de los grupos y sus características. Sólo puede aplicarse en casos en los que el resultado específico se desconoce, como ocurre cuando se quieren identificar nuevos patrones o grupos de interés (31, 32). Se basan en la medida de las distancias entre los registros (casos) y entre los grupos. Los casos se asignan a los grupos de tal manera que se tiende a minimizar la distancia entre los casos pertenecientes al mismo grupo (31). Este tipo de aprendizaje no supervisado, no dispone de una referencia externa con la que juzgar la clasificación realizada por el modelo, sino que su validez se determina según su capacidad de recoger agrupamientos interesantes de los datos y proporcionar descripciones útiles de esos grupos (31, 32). Dentro de este tipo de modelos se incluye el modelo de redes de Kohonen.

Modelo de redes de Kohonen. Basado en un modelo preliminar denominado mapa auto-organizado (*Self-Organizing Map*, SOM) (33), en el actual modelo de redes de Kohonen se genera un tipo de red neuronal que agrupa los registros de una base de datos en diferentes grupos cuya existencia no se conoce al inicio. El mapa de salida es una red o cuadrícula bidimensional de neuronas, sin conexiones entre las unidades (31, 32).

La técnica para construir estos modelos se denomina aprendizaje o modelado automático (10), y consiste en una presentación de cada registro en la capa de entrada y una propagación competitiva hacia el mapa de salida (Figura 2). Esto se repite con cada registro y cuando la red está completamente 'entrenada', los registros de dentro de un grupo se consideran similares y deben aparecer más cercanos en el mapa de salida, mientras que los registros entre grupos se

consideran diferentes y aparecen alejados. Las agrupaciones más fuertes serán aquellas que resumen muchos registros (31, 32).

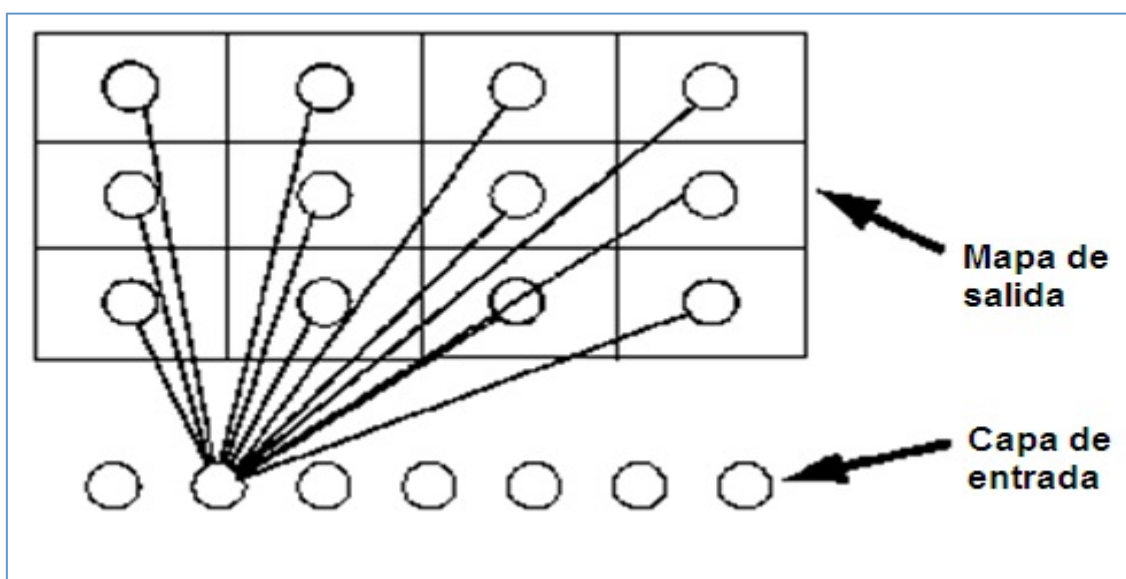


Figura 2.- Estructura de un modelo de red de Kohonen. Todas las neuronas de la capa de entrada están conectadas a todas las neuronas del mapa de salida. En la figura mostramos las conexiones que establecería una de las neuronas de la capa de entrada. Adaptado de (31).

Para el presente estudio se selecciona un modelo de análisis con datos particionados y un mapa de salida de 3x2 neuronas, que genera tres perfiles por grupo. La información obtenida para cada perfil a partir de las variables de entrada se recoge en una ficha-resumen estructurada (Tabla 4; ver Apéndice).

El procesamiento de la base de datos se ha realizado con Microsoft Office Excel v2007 e IBM PASW® Statistics 18, y el modelado con Clementine® SPSS v12.0.

Tabla 4.- Modelo de ficha-resumen de los perfiles de pacientes diabéticos que sufren RAM. Se registran los resultados con mayor porcentaje atribuible (%) respecto del total notificado para cada variable.

PERFIL				
DATOS DE LA NOTIFICACIÓN				
nº notificaciones (principio activo)	Género:	(%)	Gravedad:	(%)
	Edad (años):	(%)	Mortal:	(%)

	CC.AA.:	(%)
	Año:	(%)
PRINCIPIOS ACTIVOS (PAs)		
PA*	ATC 1:	(%)
	ATC 2:	(%)
	ATC 3:	(%)
	ATC 4:	(%)
	ATC 5:	(%)
	Sospecha:	(%)
	Indicación terapéutica:	(%)
REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS (RAMs)		
RAM*	Órgano	(%)
	HltRAM	(%)
	PtRAM	(%)
RELACIÓN CAUSAL- Algoritmo de Karch y Lasagna:		%

*se incluyen tantos apartados de principio activo (PA) y reacción adversa a medicamento (RAM) como requiera cada perfil.

4. RESULTADOS

GRUPO 1: Notificaciones con Insulina en monoterapia.

Perfil 1.1 (52 notificaciones): Mujer de más de 75 años, procedente de Cataluña, que en el año 2006 sufre RA considerada no grave y probable. El fármaco sospechoso es insulina de acción prolongada detemir, indicada para el tratamiento de diabetes, que puede producir, en primer lugar, trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración y, en segundo lugar, prurito.

Perfil 1.2 (1 notificación): caso aislado de un hombre de edad desconocida, procedente de las Islas Baleares, que en el año 2007 sufre RA considerada no grave y probable. El fármaco sospechoso es insulina de acción prolongada glargina, indicada para el tratamiento de diabetes, que puede producir trastornos del metabolismo y de la nutrición.

Perfil 1.3 (46 notificaciones): mujer de edad no definida de Cataluña que en el año 2008 sufre RA considerada grave (aunque no mortal) y posible. El fármaco sospechoso es insulina de acción prolongada glargina, indicada para el tratamiento de diabetes, que puede producir trastornos del metabolismo y de la nutrición, que pueden acompañarse de trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración. En caso de aparecer 3 o más RAs podría notificarse edema, fallo de dispositivo médico, fármaco ineficaz, insuficiencia de válvula tricúspide o fetopatía diabética.

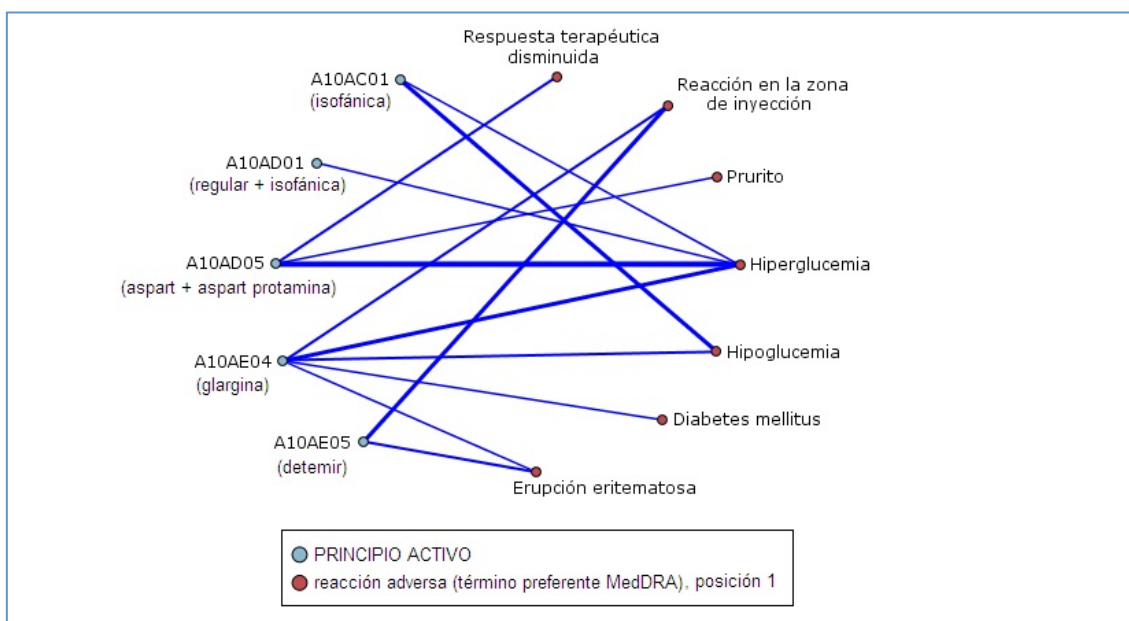


Gráfico 1.- Red de enlaces de sospechas de RAs con insulina en monoterapia. Este grupo consta de 99 notificaciones. Se observa un predominio de la relación entre insulina aspart + aspart-protamina y la RA hiperglucemia (7 casos). Otras relaciones interesantes son detemir con ‘reacción en la zona de inyección’, insulina isofánica con ‘hipoglucemia’ e insulina glargina con ‘hiperglucemia’ (todos ellos con 5 casos cada uno).

GRUPO 2: Notificaciones con AHO en monoterapia.

Perfil 2.1 (125 notificaciones): mujer de más de 75 años, procedente de Cataluña, que en el año 2004 sufre RA considerada grave (aunque no mortal) y probable. El fármaco sospechoso es la biguanida metformina, indicada para el tratamiento de diabetes, que puede producir trastornos del metabolismo y de la nutrición, trastornos renales, e incluso, pueden acompañarse de trastornos respiratorios. En caso de aparecer 4 o más RAs podría llegar a notificarse aspartato aminotransferasa elevada, diarrea, vómitos, alucinación o alteración del equilibrio.

Perfil 2.2 (13 notificaciones): mujer de más de 75 años, de Galicia, que entre los años 2006 y 2007 sufre RA considerada no grave y posible. El fármaco sospechoso es la sulfonilurea glibenclamida, indicada para el tratamiento de diabetes, que puede producir trastornos del sistema nervioso, trastornos psiquiátricos y trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos. En caso de aparecer 4 RAs podría notificarse estados disociativos.

Perfil 2.3 (388 notificaciones): mujer entre 65 y 74 años, de Aragón, que en 2008 sufre RA considerada no grave y probable. El fármaco sospechoso es la biguanida metformina, indicada para el tratamiento de diabetes, que puede producir trastornos gastrointestinales diversos como diarrea. En caso de aparecer 5 o más RAs podrían notificarse palpitaciones y vómitos.

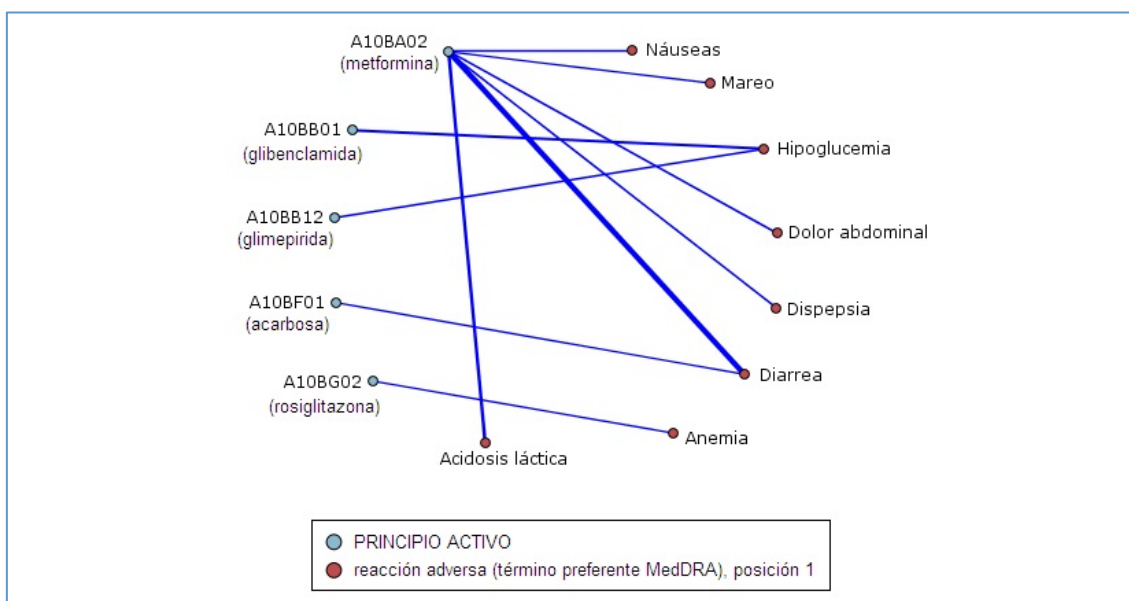


Gráfico 2.- Red de enlaces de sospechas de RAs con AHO en monoterapia. Este grupo consta de 526 notificaciones. Se observa una fuerte relación entre metformina y las RAs ‘Diarrea’ (60 casos) y ‘Acidosis láctica’ (28 casos), además de ‘dolor abdominal’, ‘dispepsia’ y ‘náuseas’. La ‘hipoglucemia’ se relaciona con las sulfonilureas glibenclamida (20 casos) y glimepirida (9 casos). En menor grado, rosiglitazona en monoterapia se relaciona con ‘anemia’ y acarbosa con ‘diarrea’.

GRUPO 3: Notificaciones con Insulina/s y principios activos no antidiabéticos.

Perfil 3.1 (39 notificaciones): mujer entre 25 y 34 años, de las Comunidades de Valencia o Madrid, que en 2008 sufre RA considerada grave (aunque no mortal) y posible. Presenta combinaciones de hasta 7 fármacos sospechosos, siendo el primero insulina de acción prolongada glargina y los siguientes hasta cuatro insulinas diferentes (rápida, intermedia o prolongada)-, y puede producir trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración. En caso de aparecer 3 o más RAs podría notificarse edema de la boca, eritema, hiperglucemia, prurito o hiperhidrosis.

Perfil 3.2 (5 notificaciones): hombre de 16 años en adelante, de Andalucía, Canarias, Castilla-León, Cataluña o Madrid, que en el año 2006 sufre RA grave (aunque no mortal) y probable. El fármaco sospechoso es insulina de acción intermedia ‘regular + isofánica’ o insulina de acción prolongada detemir - combinada con hasta 3 fármacos no sospechosos (otra insulina, vitaminas o agentes modificadores de lípidos)-, que puede producir trastornos de la piel y del tejido subcutáneo, trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración, y trastornos del metabolismo y de la nutrición (hiperglucemia). En caso de aparecer 3 o más RAs puede notificarse eritema nudoso, temblor, hiperhidrosis, hipersensibilidad, palidez o prurito.

Perfil 3.3 (24 notificaciones): hombre o mujer de 75 o más años, procedente de Andalucía, Cataluña o Comunidad Valenciana; que en el año 2004 sufre RA grave (aunque no mortal) y considerada posible/probable. El fármaco sospechoso

es la insulina de acción prolongada glargina -combinada hasta con 6 fármacos no sospechosos (una o dos insulinas adicionales y agentes antitrombóticos)-, que puede producir trastornos del metabolismo y de la nutrición (hipoglucemia). En caso de aparecer 3 o más RAs puede darse efecto farmacológico o respuesta terapéutica disminuida, presencia de anticuerpos a un fármaco, retención urinaria, lagrimeo aumentado o acaloramiento.

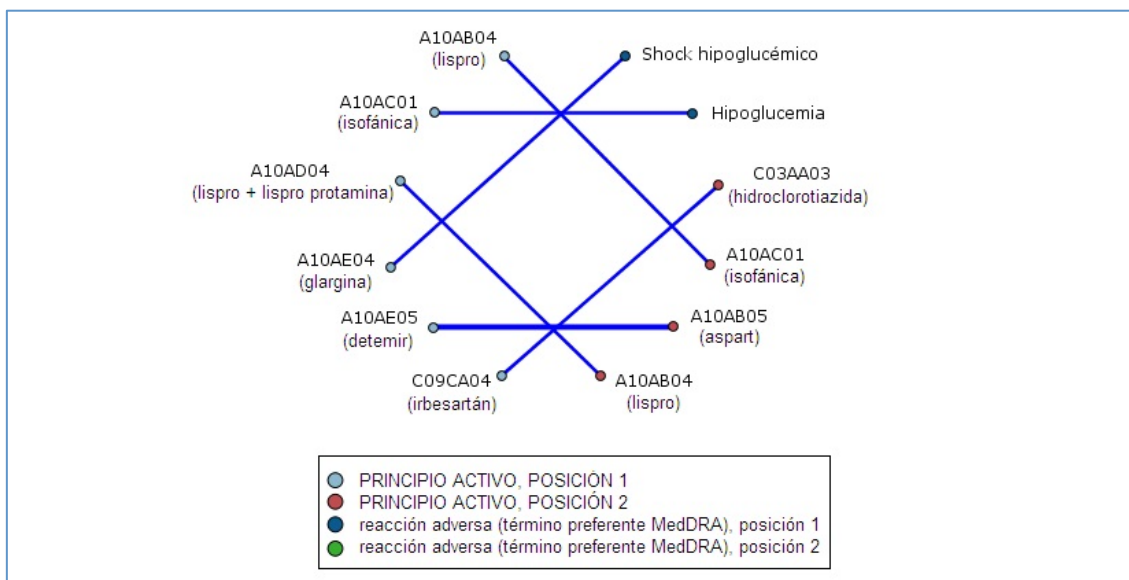


Gráfico 3.- Red de enlaces de sospechas de RAs con Insulina/s y principios activos no antidiabéticos. Este grupo consta de 68 notificaciones. Se refleja la relación entre el análogo de acción prolongada detemir -posición 1- y el análogo de acción rápida aspart -posición 2- (3 casos). La insulina rápida lispro aparece relacionada en posición 1 con insulina de acción intermedia isofánica (2 casos); y en posición 2 con el análogo de acción bifásica lispro+lispro protamina (2 casos). Existen casos de politerapia con antihipertensivos (irbesartán) y diuréticos (hidroclorotiazida) donde la insulina aparece en posiciones menos relevantes. Existe una correlación similar (2 enlaces) entre insulina isofánica y la RA 'Hipoglucemia', así como entre insulina glargina y la RA 'Shock hipoglucémico'. No destaca ninguna RA en posición 2.

GRUPO 4: Notificaciones con AHO/s y principios activos no antidiabéticos. AHO en primera posición.

El primer principio activo sospechoso puede ser o no un antidiabético oral. En este grupo analizamos los que presentan AHO en primera posición.

Perfil 4.1 (190 notificaciones): mujer entre 65 y 74 años, procedente de Galicia, que en el año 2006 sufre RA no grave y posible/probable. Presenta combinaciones de hasta 7 fármacos sospechosos, siendo el primero metformina. Los 6 restantes están relacionados con tratamientos de la sangre y órganos hematopoyéticos, sistema cardiovascular, sistema nervioso y preparados hormonales sistémicos (excluyendo hormonas sexuales e insulinas); e incluso en casos con nueve o más fármacos administrados se notifican pantoprazol, captopril o glibenclamida (tratamiento de diabetes). Estas combinaciones pueden producir trastornos gastrointestinales, del sistema nervioso, generales y alteraciones en el

lugar de administración, trastornos musculoesqueléticos y del tejido conjuntivo, renales y urinarios.

Perfil 4.2 (60 notificaciones): mujer entre 55 y 64 años, procedente de Cataluña, que en el año 2007 sufre RA grave no mortal y probable. El fármaco sospechoso es la biguanida metformina combinada con hasta 10 fármacos no sospechosos -relacionados con tratamientos del tracto alimentario y metabolismo, sistema cardiovascular y sistema nervioso-. El fármaco sospechoso puede producir trastornos del metabolismo y de la nutrición, trastornos gastrointestinales y del sistema nervioso.

Perfil 4.3 (167 notificaciones): mujer entre 65 y 74 años, procedente de Cataluña, que en el año 2008 sufre RA no grave y probable. El fármaco sospechoso es la biguanida metformina combinada hasta con 11 fármacos no sospechosos -relacionados con tratamientos del tracto alimentario y metabolismo (incluyendo vitaminas) y del sistema cardiovascular-. Se pueden producir trastornos gastrointestinales, del sistema nervioso, generales y alteraciones en el lugar de administración.

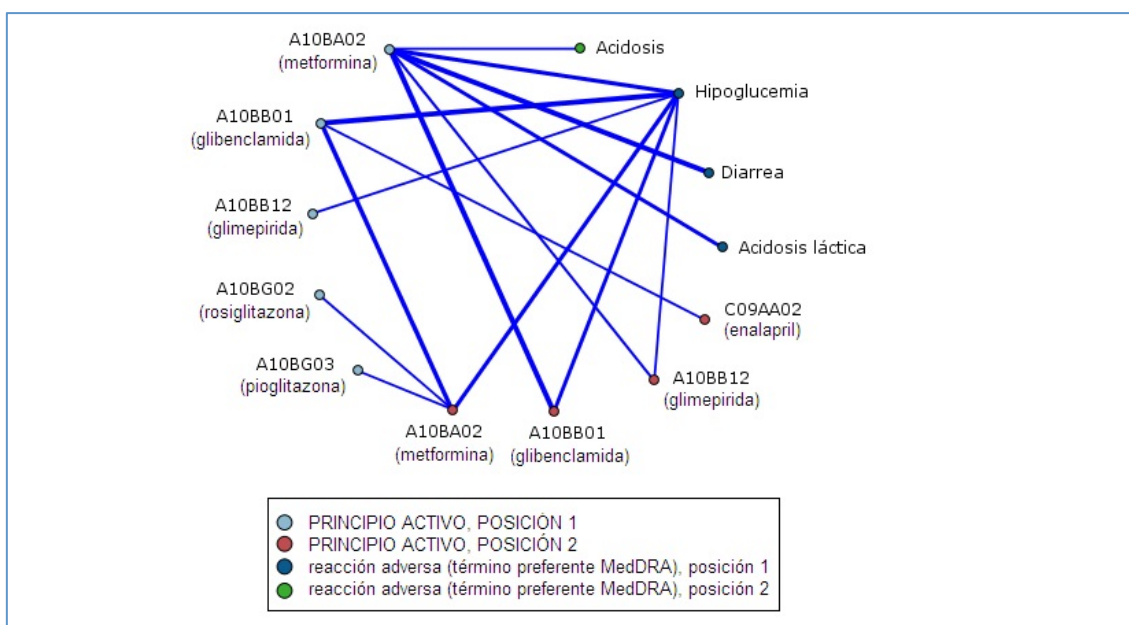


Gráfico 4.- Red de enlaces de sospechas de RAs con AHO/s y principios activos no antidiabéticos. AHO en primera posición. Este grupo consta de 417 notificaciones. Se detecta una fuerte relación entre metformina y glibenclamida (20 casos). También existen enlaces entre metformina y glimepirida (4 casos), y entre glibenclamida y el antihipertensivo enalapril (3 casos). Se observa la combinación de tiazolidindionas (rosiglitazona o pioglitazona) en primera posición y metformina en segunda posición. La RA 'Hipoglucemia' se relaciona fuertemente con metformina (16 casos), glibenclamida (18 casos) y glimepirida (6 casos) independientemente de sus posiciones. Metformina se relaciona con 'Diarrea' (11 casos), 'Acidosis láctica' (7 casos) y 'Acidosis' -no láctica- (3 casos).

GRUPO 5: Notificaciones con AHO/s y principios activos no antidiabéticos. Principio activo no antidiabético en primera posición.

Perfil 5.1 (36 notificaciones): hombre o mujer entre 65 y 74 años, procedente de Galicia, que en el año 2003 sufre RA no grave y posible. Presenta combinaciones de hasta 8 fármacos sospechosos, siendo el primero del sistema cardiovascular. Los 7 restantes son antidiabéticos orales no especificados. Estas combinaciones pueden producir trastornos de la piel y del tejido subcutáneo y trastornos gastrointestinales. En caso de aparecer 3 o más RAs podría llegar a notificarse malestar general, diarrea o dispepsia.

Perfil 5.2 (22 notificaciones): hombre entre 65 y 74 años, procedente de Cataluña, que en el año 2008 sufre RA grave (aunque no mortal) y posible. Presenta combinaciones de hasta 10 fármacos sospechosos (o sospechosos por interacción), siendo el primero del sistema cardiovascular y los restantes antidiabéticos orales –principalmente-, antiácidos, bloqueantes de canales de calcio, modificadores de lípidos, psicodélicos y psicoanalépticos. Estas combinaciones pueden producir trastornos del metabolismo y de la nutrición, de la sangre y del sistema linfático, trastornos psiquiátricos, respiratorios, torácicos y mediastínicos. En caso de presentarse 3 o más RAs podría notificarse diarrea, dolor abdominal, hipoglucemia, insuficiencia renal aguda, acaloramiento, taquicardia, nerviosismo, rubefacción y retención urinaria.

Perfil 5.3 (35 notificaciones): mujer mayor de 75 años, procedente de Cataluña, que en los años 2005 o 2007 sufre RA grave (aunque no mortal) y probable. Presenta combinaciones de 2 fármacos sospechosos, donde el primero es del sistema cardiovascular y el segundo un antidiabético oral, administrados concomitantemente con hasta 10 fármacos no sospechosos. Dichas combinaciones pueden producir trastornos del metabolismo y de la nutrición, y en caso de presentarse 3 o más RAs podría notificarse anemia, bradifrenia, disnea, niveles de fármaco elevados, apetito disminuido, edema de lengua o de cara, peso disminuido y disgeusia.

Perfil 6.3 (24 notificaciones): mujer entre 65 y 74 años, procedente de Galicia, que en 2007 o 2008 sufre RA no grave y posible. Presenta combinaciones de hasta 7 fármacos sospechosos siendo el primero insulina de acción prolongada glargina, y los restantes sospechosos -paracetamol, tramadol, ibuprofeno y diclofenaco- o sospechosos por interacción -metformina, ácido acetilsalicílico, sulpirida, glipizida, atorvastatina, diazepam-. Estas combinaciones pueden producir trastornos del metabolismo y de la nutrición, y a partir de la segunda RA, bloqueo auriculoventricular, cefalea, edema de la zona de inyección, error de medicación, hipoglucemia, insuficiencia cardiaca, mareo, reacción en la zona de inyección, síncope o visión borrosa.

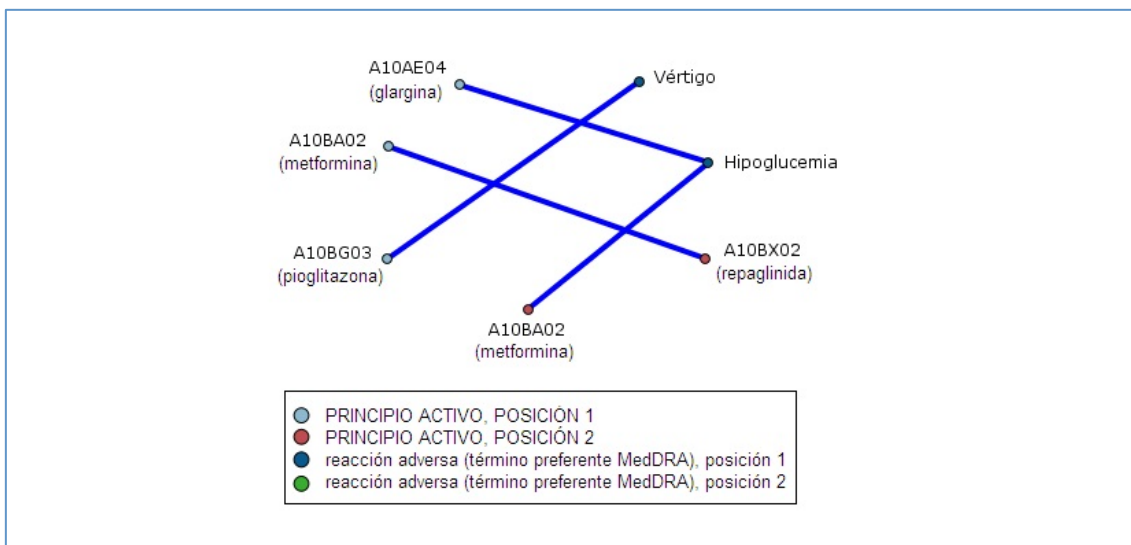


Gráfico 6.- Red de enlaces de sospechas de RAs con combinaciones de Insulina/s y AHO/s. Este grupo consta de 42 notificaciones. La relación más fuerte es la combinación de la biguanida metformina y la glinida repaglinida (2 casos), mientras que la insulina se localiza en posiciones inferiores. Respecto a las RAs, se localizan enlaces de 'Hipoglucemia' con insulina glargina en posición 1 y con metformina en posición 2 (2 casos en ambos). Con igual frecuencia aparece la relación entre 'Vértigo' y pioglitazona en primera posición. No destaca ninguna RA en posición 2.

5. DISCUSIÓN

Manteniendo la clasificación inicial de las notificaciones, analizamos las características de cada grupo y perfil, con especial interés en las combinaciones fármacos-reacciones adversas.

INSULINAS EN MONOTERAPIA

Análogos de insulinas e hiperglucemia. La relación que hemos observado mayoritariamente en pacientes que sólo utilizan insulina es la existente entre aspart+aspart protamina e hiperglucemia. Según la bibliografía existente, la hiperglucemia no se contempla como RA, sino como efecto derivado de la interacción entre insulina y fármacos (como clonidina, corticosteroides, diazóxido

o fenitoína) (19, 20, 26). En nuestra base de datos, el único caso en el que aparece como sospechoso por interacción es junto a insulina rápida aspart.

También es conocida la indicación a modo de precaución, de la posibilidad de producirse hiperglucemia matutina, siendo importante distinguir entre los tipos de hiperglucemia posibles ya que el tratamiento no es el mismo para todos (34). Debido a ello, habría que diferenciar entre los casos en los que la hiperglucemia matutina se debe al efecto Somogyi y aquellos en los que se produce hiperglucemia sin antecedente hipoglucémico alguno conocido como fenómeno del alba. El tratamiento de la hiperglucemia de rebote consistiría en reducir las dosis de insulina y/o tomar una fuente de carbohidrato antes de acostarse, mientras que en el otro caso debería ajustarse la dosis de insulina nocturna para favorecer que las necesidades de insulina entre las 4 y las 7 de la mañana queden cubiertas (34). Creemos que este último caso podría ser más acertado para la insulina aspart+aspart protamina en nuestro estudio, debido a que presenta también relación con la RA 'Respuesta terapéutica disminuida'. Ya que el hecho de confundir entre los tipos de hiperglucemia matutina podría resultar en una hipoglucemia nocturna aún más grave, sería interesante que se diferenciase entre estos tipos de hiperglucemia en la codificación y que se incluyesen como RAs en las fichas técnicas de insulina.

Otras relaciones mayoritarias entre usuarios de insulina en monoterapia son detemir-reacción en la zona de inyección y glargina-hiperglucemia. Cada uno de ellos aparece también reflejado en perfiles diferentes **-perfil 1.1 y perfil 1.3**, respectivamente-, que se caracterizan por ocurrir en mujeres en la segunda mitad del periodo de estudio y en las que se notifican como sospechosas las insulinas de acción prolongada.

Por su parte, la insulina glargina se asocia más en nuestro estudio a casos de hiperglucemia que de hipoglucemia, coincidiendo así con el **perfil 1.3** que se caracteriza por no presentar una edad mayoritaria de aparición de la RA y que además esta última se considera grave -aunque no mortal- en el 100% de los casos.

Adicionalmente, la insulina isofánica es la que presenta mayor relación con hipoglucemia. Según estudios en los que se comparan glargina e isofánica (35), la insulina glargina es igual de efectiva que la insulina isofánica en el control glucémico, especialmente en diabetes tipo 2, y se asocia con menos episodios nocturnos de hipoglucemia sintomática.

Esto apoya que los casos de hiperglucemia con insulinas análogas se deben más a un fenómeno de alba o a disminución del nivel de insulina que a una hiperglucemia de rebote. A su vez, la aparición del fenómeno de alba se conoce que

es menor si la insulinización del paciente ha sido adecuada (36) y que es más frecuente que el efecto Somogyi.

Estas hiperglucemias de insulinas en monoterapia pueden derivarse de una insulinización *de novo* o un cambio de insulina humana a análogo realizados inadecuadamente. Por tanto, en los casos en los que se realicen estos cambios, debería considerarse el diagnóstico de estos fenómenos recomendando un control de glucemia entre las 3 y las 5 de la madrugada durante varias noches (37).

Análogos de acción prolongada y reacción en la zona de inyección. Se podría decir que una RA específica del grupo de insulinas de acción prolongada (detemir, glargina) es la reacción en el lugar de administración (dolor, enrojecimiento, ronchas, hinchazón, picor) por presentar una mayor frecuencia de aparición que con insulina isofánica, aunque es generalmente transitoria y desaparece al continuar el tratamiento (38, 39). Estos datos concuerdan con el **perfil 1.1**, que se produce predominantemente en mujeres y en edades de 75 o más años.

Aunque cualquier terapia insulínica puede producir reacciones en el lugar de inyección, la gran afinidad de los análogos de acción prolongada tanto por la albúmina tisular subcutánea como por la plasmática, así como la fuerte asociación de las propias moléculas de insulina en el lugar de inyección condiciona sus características de absorción lenta y acción prolongada (40, 41); y es a su vez responsable de estas reacciones del tejido subcutáneo.

La aparición de RAs en la zona de inyección puede ser sinónimo de una administración inadecuada, ya que las recomendaciones de rotación del punto de inyección dentro de la misma zona -dadas específicamente para reducir o prevenir estas reacciones- no parecen considerarse en estos casos.

El **perfil 1.2** consta de un único caso aislado que no concuerda con los datos de ningún otro perfil definido, por lo que demuestra la validez del modelo aplicado tanto para detectar características comunes entre los casos como para detectar casos atípicos.

Dentro del **perfil 1.3** se localiza el único caso de fetopatía diabética presente en la base de datos. Esta RA es considerada como posible tras la administración de insulina detemir. Existen estudios que demuestran que en mujeres con diabetes gestacional, el uso de análogos de acción rápida no produce efectos adversos ni en la madre ni en el feto. La insulina prolongada glargina no está recomendada durante el embarazo aunque ha demostrado no producir mayor incidencia de malformaciones congénitas comparada con la insulina humana, mientras que no existen suficientes datos para la valoración de detemir (42). El hecho de que muchas mujeres diabéticas que estén utilizando análogos de acción prolongada tengan embarazos no planificados aumentaría la posibilidad de RAs en el embarazo.

AHOS EN MONOTERAPIA

Las observaciones mayoritarias van dirigidas a metformina y sulfonilureas debido a su frecuencia de aparición. Destaca el uso de rosiglitazona asociada a anemia.

Aunque en el periodo de estudio el uso de metformina no supera al de sulfonilureas, algunas investigaciones utilizan este tipo de resultados para justificar que metformina, en la década posterior al estudio UKPDS, ha ejercido más un papel de complemento de las sulfonilureas -o de otras combinaciones de AHOs-, que de fármaco de primera línea (43). Además se añade que la terapia combinada de sulfonilureas y metformina esté tan extendida (más del 67% de los usuarios de AHOs a nivel internacional) indica que los efectos adversos de metformina no son una gran barrera para su uso ni explican su menor uso en monoterapia.

Esto contrasta con nuestra observación de un mayor número de notificaciones de casos en monoterapia con metformina (220) que con sulfonilureas (91), por lo que consideramos que, al menos en España, las RAs que genera la metformina sí pueden ejercer limitaciones para su perfil de uso.

Metformina y acidosis láctica. La acidosis láctica asociada a metformina (MALA en sus siglas en inglés) es una complicación metabólica grave que ocurre habitualmente por acumulación de metformina en pacientes que alcanzan estados de deshidratación o que desarrollan fallo renal agudo. También hay casos debidos a exposiciones agudas a este principio activo. Mientras que MALA no es común, su morbilidad y mortalidad asociadas pueden ser elevadas (en el 50% de los casos se produce la muerte). Secundariamente a esta reacción, el paciente puede experimentar cambios en su sistema nervioso central, colapso cardiovascular, fallo renal, y muerte en la mitad de los casos (44).

Varios de estos síntomas quedan reflejados en el **perfil 2.1**, especialmente la afectación del sistema nervioso central (alucinaciones, alteraciones del equilibrio) y trastornos renales. Este perfil se da mayoritariamente en mujeres, en edades de 75 o más años, la reacción es considerada grave en un 100% de los casos y mortal en un 4,8% de los mismos. También llama la atención que casi un tercio de los casos ocurren en Cataluña. Adicionalmente, hemos observado que un 45% de casos con asociación metformina-acidosis láctica se producen con metformina en monoterapia.

Los primeros objetivos de tratamiento de MALA son el restablecimiento del equilibrio ácido-base y eliminación de metformina, mediante hemodiálisis y terapia con bicarbonato. No existe un antídoto específico (44). En el Centro Regional de Farmacovigilancia de Castilla-la Mancha se hicieron eco de los cinco casos de sospechas de acidosis láctica, dos de los cuales tuvieron resultado de

muerte, situación que motivó una alerta de seguridad en julio de 2003 (45). En el extenso estudio UKPDS sobre el control glucémico de metformina no se produjo ningún caso de muerte por acidosis láctica. A esto hay que añadir que uno de los posibles motivos de desaparición de otras biguanidas como fenformina o buformina es que metformina tiene entre 10 y 20 veces menos riesgo de producir acidosis láctica (46).

Respecto a la información incluida en las fuentes bibliográficas al respecto de esta RA, en el Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, la acidosis láctica por metformina se encuadra dentro de las RAs hematológicas (47), en vez de en metabólicas como correspondería según se recoge en el diccionario MedDRA (17).

También podría ser de utilidad la inclusión de un ítem en la tarjeta amarilla que indique si el paciente consume o no alcohol. El consumo de alcohol en pacientes que toman metformina aumenta el riesgo de hipoglucemia (si el consumo es agudo) y de acidosis láctica (si el consumo es crónico) (19, 20, 26).

Metformina y diarrea. Se trata de una RA cuya relación con metformina es conocida. Se sabe que es dosis dependiente y debido a ello presenta especificaciones de uso recogidas en su ficha técnica. El comienzo está indicado con una dosis baja (500-850 mg en 2-3 tomas diarias) que puede aumentarse tras 10-15 días según los niveles de glucemia (48). El aumento lento de la dosis ha demostrado mejorar la tolerancia gastrointestinal. En nuestros resultados observamos que un 44% de los casos de asociación de metformina-diarrea se producen en monoterapia. Estas características concuerdan con el **perfil 2.3** que se produce mayoritariamente en mujeres, en edades comprendidas entre los 65 y los 74 años y, llamativamente, casi un cuarto de los casos se dan en Aragón.

Existen estudios sobre la prescripción de metformina en la población con mayor riesgo de desarrollar RAs que han demostrado que este principio activo se administra a pacientes en los que no estaría recomendado (contraindicado con valores de creatinina superiores a 0,132mMol/l, respecto a su riesgo de acidosis láctica), y se ha observado como efecto adverso diarrea que ha requerido disminución de la dosis de metformina (49). Es destacable que el 83% de las intervenciones farmacéuticas realizadas en este último estudio, que aconsejaban la suspensión del tratamiento con metformina, fueron aceptadas, por lo que el seguimiento farmacoterapéutico se posiciona como un servicio de gran utilidad en estos casos.

Metformina actualmente se indica como fármaco de primera línea en el control glucémico de pacientes con diabetes tipo 2, incidiendo en su potencial aplicación en dosis elevadas para maximizar el control glucémico sin aumentarse los efectos adversos gastrointestinales (50).

Por último, cabe indicar que se ha estudiado que ambas condiciones producidas por metformina –diarrea y acidosis láctica- pueden estar relacionadas. Una ingesta oral reducida junto a la deshidratación secundaria debida a la diarrea puede resultar en un fallo renal agudo que precipita la aparición de MALA (51).

Sulfonilureas e hipoglucemia. Según nuestros resultados, los casos de hipoglucemia por sulfonilureas en monoterapia se asocian fundamentalmente al uso de glibenclamida, y en menor medida al de glimepirida. A pesar de ello, los casos en monoterapia -respecto al total de casos (monoterapia y politerapia)- son inferiores para glibenclamida (34,5%) que para glimepirida (42,8%); en cambio, esta última parece ser más segura en caso de combinaciones con otros AHOs o insulina.

Es conocido que glibenclamida tiene un mayor riesgo de hipoglucemias e hiperinsulinemias. Otras sulfonilureas de segunda generación, como gliclazida y glimepirida, podrían ser más útiles en ancianos por el menor riesgo de hipoglucemias graves –demostrado en comparaciones de glimepirida y glibenclamida (52)-; y además, al ser de toma única diaria, puede ayudar a mejorar el cumplimiento terapéutico (6). En cambio, otros autores consideran que los efectos secundarios entre las diferentes sulfonilureas son similares, y que cuanto más larga es la duración de acción más prolongado será un episodio hipoglucémico en caso de producirse, por lo que consideran prudente recurrir a sulfonilureas de acción corta -glibenclamida- en pacientes ancianos con hábitos dietéticos irregulares (53).

En nuestro estudio, observamos que Galicia es la única Comunidad Autónoma con más RAs por sulfonilureas que por biguanidas (demostrando una posible infrautilización de metformina), siendo DAONIL 5mg 30 comprimidos la especialidad notificada como sospechosa más frecuentemente. Galicia también se caracteriza por ser la tercera Comunidad en número de notificaciones de RAs relacionadas con antidiabéticos durante el periodo de estudio (154 casos), y los pacientes diabéticos de esta región que sufren RAs tienen entre 65-74 años, la mayoría son mujeres y suelen presentar hipoglucemias no graves. Nuestros resultados se confirman con estudios realizados en Galicia donde se concluye que se utiliza más glibenclamida que glimepirida en pacientes pensionistas frente a no pensionistas y que su uso no se ajusta a las recomendaciones de las guías terapéuticas disponibles (6).

Estas mismas características diferenciadoras también se observan en el **perfil 2.2**, donde se observan reacciones no graves, mayoritariamente en mujeres, en edades de 75 o más años, durante la segunda mitad del periodo, y -concordando con los datos anteriores- más de la mitad de los casos ocurren en Galicia.

También hemos observado en el País Vasco un mayor número de RAs de hipoglucemia, a la vez que una mayoría de RAs producidas por sulfonilureas, pero no estrictamente por glibenclamida. Esto último coincide con los datos de descenso de uso de este principio activo a lo largo del periodo, presentes tanto en nuestro estudio como en otros consultados (54). Aun así estimamos que glibenclamida podría seguir siendo responsable de estas hipoglucemias ya que el resto de sulfonilureas de primera generación como clorpropamida o tolbutamida, también tendentes a producir estos episodios, presentan un uso residual.

Respecto a glicimepirida -incluida en 1997-, sólo parece adoptarse la evidencia de su uso preferente en ancianos frente al uso de glibenclamida por menor riesgo de hipoglucemia -conocida desde 2001 (52)- tras las recomendaciones del NICE de 2002 (55). Aun así, según recogen algunos estudios, en guías españolas posteriores aún se recomienda el uso de glibenclamida como fármaco de primera elección en pacientes con normopeso con glucemia no controlada por medidas no farmacológicas (56).

En nuestros resultados no se recoge ningún caso de RA con gliclazida como fármaco sospechoso cuando su uso medio ha sido de un 9% del total de AHOs. Este hecho viene apoyado por los resultados del estudio ADVANCE que revelan que el uso de gliclazida de liberación retardada es la opción más segura dentro del tratamiento con sulfonilureas (57, 58).

Rosiglitazona y anemia. Aunque la aparición de anemia suele ir más asociada al uso combinado de rosiglitazona y metformina, en nuestro estudio observamos una frecuencia elevada de casos en monoterapia con rosiglitazona que presentan anemia. De hecho, el 58% de los casos en los que se presenta dicha relación rosiglitazona-anemia se producen en monoterapia (12 casos).

Esta RA hematológica se considera frecuente (1,9%), con disminución del hematocrito alrededor de un 3,3% y descensos de hemoglobina de 1 g/dL. Su aparición se produce en los tres primeros meses de tratamiento o al aumentar la dosis de rosiglitazona. Se suele asociar a hemodilución (26) y no suele reportar gravedad ni consecuencias clínicas (59). Existen estudios en los que también se ha asociado el tratamiento con rosiglitazona con una reducción de los niveles de hemoglobina dosis-dependiente (60).

En otros estudios se recalca la asociación entre la anemia y el aumento del riesgo de complicaciones diabéticas -incluyendo nefropatía, retinopatía, neuropatía y enfermedad macrovascular-; por lo que consideran que esta RA puede ser significativa en la determinación de la evolución tras un fallo cardiaco y del daño orgánico inducido por hipoxia en casos de diabetes. El fallo renal en la síntesis de eritropoyetina parece un factor fundamental en su aparición (61).

Para la prevención de esta RA se recomienda un control óptimo, tanto metabólico como de presión arterial. Además, la detección de anemia puede utilizarse para identificar a pacientes con diabetes que tengan mayor riesgo de sufrir resultados clínicos adversos según los estudios consultados (61).

INSULINAS EN POLITERAPIA

Existe una baja frecuencia de coincidencias entre los principios activos más sospechosos. Esto se debe, en parte, a que el grupo de notificaciones en las que aparece insulina en politerapia -bien con otro tipo de insulina o bien con otros fármacos no antidiabéticos- es el segundo menos numeroso. Aun así, destacan la relación detemir-aspart y, en especial, la relación glargina-shock hipoglucémico contrastando con la mayor frecuencia de glargina-hiperglucemia observada en monoterapia.

Insulinas rápidas combinadas con insulinas intermedias/prolongadas: hipoglucemias e hiperglucemias. Se observa una relación de insulinas intermedias o prolongadas con insulinas rápidas, siempre con un análogo implicado en esa asociación. El **perfil 3.1** sería el más ajustado a esta situación, con insulina glargina como principal análogo de acción prolongada sospechoso, y en el que se producen RAs en personas jóvenes o adultas. Los otros dos perfiles no se adaptan a esta descripción ya que se caracterizan por presentar sólo un principio activo sospechoso en la mayor parte de los casos.

Estas combinaciones de insulinas rápidas-prolongadas que destacamos coinciden con una mayor presencia de notificaciones de insulinas de acción rápida y de acción prolongada en combinación con al menos otro principio activo.

Tras considerar los resultados del gráfico de red y de los perfiles de insulina en politerapia, podemos concluir que el segundo principio activo suele ser, frecuentemente, otra insulina. Creemos que esta mayor notificación en la que se implican insulinas de acción prolongada y rápida se debe a la implementación de las recomendaciones de su uso combinado en tratamientos intensivos (62, 63), al haber demostrado estas mejoras en el control glucémico (64, 65), observándose tanto en pacientes con diabetes tipo 1 como con diabetes tipo 2 (66, 67).

Este estricto control puede llevar a la aparición de episodios de descompensación glucémica con su consiguiente riesgo. De hecho, hemos observado en nuestros resultados que, entre los casos mortales, los dos únicos en los que estaban implicadas insulinas presentan asociación de insulina rápida (aspart) con insulinas bifásicas (lispro+lispro protamina) y/o prolongadas (glargina o detemir). En uno de los casos se produce coma diabético y en el otro se producen malformaciones congénitas.

Por otro lado, algunos autores han estudiado la tendencia a usar la mezcla de insulina aspart con insulina detemir en la misma jeringa como régimen habitual para minimizar el número de inyecciones diarias -especialmente en niños con diabetes tipo 1- que va en contra de las advertencias del laboratorio fabricante. Sus resultados constatan que tal práctica produce un efecto adverso debido al descenso acusado del pico de acción de la insulina aspart y a la prolongación de su duración de acción frente a la administración separada de aspart y detemir (68).

Debemos puntualizar que, en nuestro país durante el periodo de estudio, no existen presentaciones en vial para insulina detemir, pero sí para insulina glargina. En la ficha técnica de glargina se indica que no se puede mezclar con otra insulina o diluirse ya que puede cambiar su tiempo/perfil de acción y la mezcla puede precipitar (69), mientras que en la ficha técnica de aspart (vial) se indica que sólo puede mezclarse con insulina NPH (70).

En nuestra base de datos no aparece ningún caso en el que se administre insulina aspart e insulina de acción prolongada ambas en viales por lo que la práctica comentada no parece muy extendida en España. Aun así debería estudiarse si la administración al mismo tiempo y en una zona cercana de ambas insulinas -aunque no sea en la misma jeringa- puede alterar el perfil farmacodinámico de la insulina de acción rápida pudiendo generar hiperglucemias. Así por ejemplo, en el **perfil 3.1**, además de las reacciones en la zona de inyección características de las insulinas prolongadas se detecta hiperglucemia. Este perfil también se caracteriza por presentar casos graves (el 5,1% son mortales).

El **perfil 3.2** es poco frecuente, se da mayoritariamente en hombres -tanto jóvenes como adultos- en tratamiento con insulina regular+isofánica o detemir, y se dan casos graves aunque la mayoría no mortales. Lo llamativo es la presencia de insulinas, vitaminas y agentes modificadores de los lípidos como fármacos no sospechosos. Respecto a los dos últimos, no hemos encontrado ninguna interacción conocida. Los casos de hiperglucemia los consideramos asociados al uso de insulina regular+isofánica o detemir para cubrir las necesidades de insulina durante la noche con posibilidad de producirse hiperglucemias matutinas.

Respecto al **perfil 3.3** hay que destacar que se produce en pacientes de mayor edad en los que está implicada glargina como único fármaco sospechoso, siendo la mitad de los casos graves y mortales. Es contradictorio que entre los fármacos considerados no sospechosos se encuentren otras insulinas, cuando la RA más frecuentemente observada en este perfil es la hipoglucemia, por lo que creemos que debía haberse tenido en cuenta en la notificación. Esto explicaría por qué en la red de enlaces destaca la relación glargina-shock hipoglucémico, cuando en monoterapia glargina se relaciona más frecuentemente con hiperglucemia.

En este perfil también observamos casos que concuerdan con RAs de tipo alérgico inherentes a la utilización de insulina, como son la formación de anticuerpos anti-insulina que producen una disminución del efecto farmacológico y de la respuesta terapéutica (26, 69).

Combinaciones de análogos de lispro. Son casos en los que se observa asociación entre insulina lispro con insulinas intermedias (isofánica) o bifásicas (lispro+lispro protamina). Según su ficha técnica, la insulina de acción rápida lispro sólo está autorizada para su uso en combinación con insulina de acción prolongada o sulfonilureas (71). Es por ello que pensamos en la existencia de un uso combinado incorrecto con este análogo de acción rápida.

Insulina, irbesartán e hidroclorotiazida. Respecto a la asociación entre irbesartán e hidroclorotiazida observada en determinados casos donde también se utiliza insulina, hemos descubierto que tal asociación se debe a una codificación imprecisa. En la base de datos original, siempre que aparecen los principios activos irbesartán e hidroclorotiazida lo hacen porque el paciente toma una combinación a dosis fija (código C02F2), a pesar de ello, se codifican por separado. Al realizar la actualización de los códigos ATC observamos que no existe un código concreto para esta combinación -en el índice ATC/DDD 2011 (72, 73) la única posibilidad de nombrar correctamente este tipo de formulación sería asignándole el código de 'Irbesartán y diuréticos C09DA04' en el que no se especifica el diurético de la combinación-. Es por ello que, al igual que en la base de datos original, también adjudicamos un código a cada principio activo por separado, motivo por el que aparecen relacionados en la red de enlaces. Este es un ejemplo de la relevancia que pueden tener algunos defectos en la notificación a tener en cuenta en estudios posteriores.

A pesar de lo comentado, y dado que la combinación de insulina e hidroclorotiazida (combinada o no con irbesartán) existe en la base de datos, queremos hacer hincapié en la posible inhibición del efecto hipoglucemiante de la insulina en presencia de diuréticos tiazídicos, interacción ampliamente conocida (26). En nuestros datos no hemos observado ninguna RA hiperglucémica en presencia de insulina e hidroclorotiazida.

AHOS EN POLITERAPIA

Hemos observado pocos casos en los que coincidan las asociaciones de principios activos independientemente de la posición de sospecha que ocupe el AHO, es decir, en los que coincidan combinaciones del perfil 4 y del perfil 5.

El perfil 4 se caracteriza por presentar **AHOs notificados en primera posición de sospecha** (según la clasificación preliminar, ver Método) y donde los principios activos notificados en segunda posición también han sido AHOs en su mayoría, situándose por delante de otros fármacos no antidiabéticos. Es llamativa la aparición de la relación metformina-hipoglucemia y metformina-acidosis, no observadas en monoterapia. A continuación comentamos estas y otras de las relaciones más relevantes observadas en este perfil 4:

Metformina y sulfonilureas. Se sabe que la acción antihiper glucemiante de metformina presenta efecto sinérgico con las sulfonilureas, de hecho está indicada su combinación en adultos. Esta sinergia puede desencadenar fenómenos de hipoglucemia que la metformina por sí sola no suele producir (26). El **perfil 4.1** es el único que presenta como sospechoso de RA el uso concomitante de metformina y sulfonilureas; y se caracteriza por producir casos no graves, mayoritariamente en mujeres, y en edades entre los 65 y 74 años. Es especialmente interesante el alto porcentaje de casos observados en Galicia, concordando con el ya comentado mayor uso de glibenclamida en monoterapia en esta región en el perfil 2.2.

Adicionalmente, hemos observado una mayor relación entre metformina y glibenclamida (20 registros) que entre metformina y glimepirida (4 registros). Nuestros resultados coinciden tanto con estudios en los que las combinaciones de glimepirida o gliclazida con metformina presentan menor riesgo (en concreto, menor mortalidad) que la combinación de glibenclamida con metformina (74); como con otros estudios que demuestran que la combinación de glimepirida+metformina –en este caso a dosis fija-es más eficaz que glibenclamida+metformina en la consecución de los objetivos glucémicos, al reducir el número de episodios de hipoglucemia en pacientes diabéticos tipo 2 no controlados (75).

Estas combinaciones de sulfonilureas y metformina han sido ampliamente recomendadas (76-79) y aplicadas en el tratamiento antidiabético en España (19, 22, 25), aunque en nuestro país sólo se presentan en formulaciones separadas. Teniendo en cuenta el impulso actual de las formulaciones de combinaciones a dosis fijas -debido a la simplificación de la dosificación y posible mejora del cumplimiento terapéutico-, creemos que la combinación metformina+glimepirida podría ser una opción terapéutica interesante.

Según nuestros resultados, el número de notificaciones correspondientes a terapia combinada de sulfonilureas y metformina es bajo (117 casos) comparado con las notificaciones respectivas de estos fármacos en monoterapia.

Esto contrasta con estudios que valoran la terapia combinada de sulfonilureas y metformina como la más ampliamente utilizada (más del 67% de los usuarios de AHOs a nivel internacional), debido a una aplicación de metformina

como fármaco suplementario en tratamientos con sulfonilureas u otros AHOs (43), por lo que, en estos casos, cabría esperar una mayor proporción de RAs.

En el 84% de los casos de nuestro estudio donde se notifican metformina y sulfonilureas, también aparecen notificados otros principios activos. De hecho, entre los casos mortales, hemos observado con mayor frecuencia combinaciones de metformina con sulfonilureas y con otros AHOs (3 casos), que combinación de los dos primeros exclusivamente (1 caso).

A propósito del único caso mortal donde los fármacos implicados son metformina y glibenclamida, observamos que sólo se considera sospechoso al fármaco metformina cuando ninguna de las RAs registradas es específica de este principio activo (el caso presenta acidosis metabólica, anuria, hipoglucemia, hipotensión y malestar general; sin presencia de acidosis láctica). A su vez, ambos tratamientos -metformina y glibenclamida- fueron concomitantes, por lo que la hipoglucemia generada podría asociarse más al uso combinado que al efecto de metformina por sí sola (26). Por tanto, creemos recomendable que en casos con desenlace mortal, todos aquellos medicamentos concomitantes con posibilidad de producir alguna de las RAs notificadas, sean considerados sospechosos o, en su defecto, sospechosos por interacción.

En términos generales, y aun teniendo en cuenta el riesgo de hipoglucemia asociado a las sulfonilureas y su efecto sinérgico con metformina, creemos que el uso combinado de ambos fármacos ha tenido buenos resultados durante los años de estudio en lo referido a seguridad (sólo 19 casos donde aparece la combinación de sulfonilurea y metformina sin ningún otro fármaco). En cambio, en el resto de notificaciones con sulfonilureas, AHOs y terceros principios activos, el riesgo de sufrir una RA parece estar más asociado a dicha combinación con terceros que a RAs específicas de los principios activos. Por lo tanto, las politerapias de más de dos AHOs parecen presentar mayores riesgos de seguridad en detrimento de su potencial efecto sinérgico para la consecución de un buen control glucémico.

Metformina y acidosis. En nuestro estudio, la presencia de acidosis (diferente de acidosis láctica) como RA relacionada con metformina en casos de politerapia -cuando no se ha observado en monoterapia-, lleva a pensar en la influencia del resto de medicación en su aparición. De hecho, existen estudios recientes sobre casos de acidosis inducida por metformina debida a RAs con otros fármacos (80). Sería interesante que, en estos casos, se registrase si ha habido RAs previas y, si así fuese, notificar los fármacos implicados como sospechosos por interacción, lo que facilitaría el estudio de señales.

Glitazonas y metformina. Hemos observado el mismo número de relaciones entre rosiglitazona y metformina que entre pioglitazona y metformina en las

notificaciones donde estos fármacos se consideraban sospechosos y se administran en formulaciones independientes.

Tampoco hemos observado diferencias entre la notificación de glitazonas combinadas con metformina en formulaciones separadas y la de glitazonas sin combinar con metformina.

En cambio, considerando las notificaciones con glitazonas+metformina a dosis fijas (un 51% del total de casos con glitazonas), existe una mayor frecuencia de la combinación con rosiglitazona (94%) que con pioglitazona (6%).

Si consideramos tanto la administración por separado como la combinación a dosis fija, observamos mayor frecuencia de notificación en mujeres entre los tratados con rosiglitazona y metformina (tanto por separado como combinados a dosis fija), y mayor frecuencia en hombres para pioglitazona y metformina. Esto último concuerda con algunos estudios en los que se indica que los hombres tienen más probabilidad de ser tratados con glitazonas que las mujeres (81).

Para el resto de combinaciones a dosis fijas de glitazonas, sólo se observan ligeras diferencias en la aparición de RAs según el género para los hombres tratados con rosiglitazona+glimepirida.

Respecto al uso combinado de glitazonas y otros fármacos no antidiabéticos, observamos mayor frecuencia de tratamiento con estatinas entre los que toman glitazonas y mayor frecuencia de tratamiento con IECAs entre los que toman AHOs diferentes a glitazonas. Estos resultados difieren en parte con estudios donde se indica que los pacientes en tratamiento con glitazonas tienen más probabilidad de estar tratándose con medicamentos cardioprotectores, -tanto estatinas como IECAs- que en cualquier otro grupo de pacientes tratados con AHOs, aunque puntualizan que las diferencias se limitan a fármacos recomendados como prevención primaria en la mayoría de diabéticos, mientras que la prescripción de otros medicamentos cardioprotectores es similar (81).

También llama la atención que en alrededor de un 75% de las notificaciones en las que aparecen combinadas glitazonas, estatinas y/o IECAs, los pacientes estaban siendo tratados con combinaciones a dosis fijas de glitazonas y metformina. Esto nos lleva a plantearnos si el uso de combinaciones a dosis fijas favorece el aumento del número de fármacos en politerapia, y si esto tiene implicaciones en la seguridad del tratamiento, ya que la administración por separado de una glitazona y metformina parece haber resultado más segura.

Metformina y fármacos del Sistema Nervioso. El **perfil 4.2.** se da mayoritariamente en mujeres y en la edad adulta (entre los 55 y 64 años), siendo el fármaco sospechoso metformina. Es interesante la presencia de fármacos del sistema nervioso, aunque aparezcan como no sospechosos. Algunos de ellos

pertenecen al subgrupo de ansiolíticos (N05B) y al de hipnóticos y sedantes (N05C). Existen estudios donde también se ha observado un mayor consumo de antidepresivos y ansiolíticos en mujeres diabéticas, situación que junto a una mayor utilización de AINEs y otros analgésicos, podría sugerir que las mujeres diabéticas tienen peor calidad de vida (6, 82). De hecho, en general las mujeres declaran tener peor estado de salud que los hombres (83).

Metformina y fármacos del Sistema Cardiovascular. El **perfil 4.3** se caracteriza por la combinación de metformina con fármacos no sospechosos. Esta combinación puede darse con pocos fármacos en la mayoría de los casos, o bien con muchos fármacos en algunos casos aislados. Entre dichos fármacos no sospechosos, los del sistema cardiovascular se presentan con frecuencia. A pesar de la politerapia existente en este perfil, las RAs son mayoritariamente gastrointestinales, no revisten gravedad y no están asociadas con trastornos del metabolismo o alteraciones cardiovasculares. Creemos que el hecho de darse este perfil fundamentalmente en mujeres, y entre los 65 y 74 años, puede influir en la reducida presencia de RAs cardiovasculares debido a que este grupo de pacientes presenta menores factores de riesgo asociados que los hombres. Así, por ejemplo, se sabe que uno de los factores de riesgo cardiovascular como es el tabaquismo es menor en mujeres de edad avanzada con diabetes tipo 2 (7).

Respecto a las diferencias entre géneros, según cifras oficiales de la ENS, el sobrepeso y la obesidad en España es mayor en hombres que en mujeres (83); y también es conocido que la obesidad en pacientes diabéticos se relaciona con mayor aparición de complicaciones macrovasculares, peor control metabólico y peor cumplimiento del tratamiento (84). A su vez, las mujeres refieren más controles preventivos frente a factores de riesgo cardiovascular como son la hipertensión arterial o la hipercolesterolemia que los hombres (83).

Glibenclamida y enalapril. Según nuestros resultados, habría 19 casos donde aparecen relacionados glibenclamida y enalapril, con presencia de hipoglucemia en 4 de ellos -dos casos son graves aunque ninguno es mortal-. En algunas de estas notificaciones de hipoglucemia se considera enalapril como fármaco sospechoso por interacción y en otros como no sospechoso, cuando se conoce que la asociación entre sulfamidas hipoglucemiantes e IECAs en un paciente diabético puede producir, excepcionalmente, hipoglucemia. Es una RA que también puede presentarse con otros IECAs -como captopril-, y con otros hipoglucemiantes -como la sulfonilurea gliclazida o la propia insulina (85). También se sabe que este fenómeno es más probable que ocurra durante las primeras semanas de tratamiento combinado y en pacientes con insuficiencia renal (86).

Sería recomendable que en la ficha técnica de glibenclamida (87), además de la indicación general sobre su interacción con inhibidores de la ECA, se indicara que se ha observado con enalapril y captopril.

Glibenclamida y acarbosa. Sólo hemos encontrado un caso con hipoglucemia en el que estaban implicadas glibenclamida y acarbosa exclusivamente. Aunque la acarbosa posee un efecto antihiper glucemiante, sin ser hipoglucemiante por sí misma, en pacientes tratados con otros AHOs o insulina pueden producirse casos de shock hipoglucémico (85). El conocimiento de dicha interacción es reciente (87, 88), y puede que esto haya evitado un mayor uso combinado de ambos principios activos, influyendo positivamente en una mejora del perfil de seguridad. En relación al restablecimiento de la glucemia en estos casos, en la ficha técnica de glibenclamida se recomienda la 'toma de glucosa' en vez de 'preferiblemente en forma de glucosa', o bien, se podría especificar que debe utilizarse sólo glucosa si el paciente usa acarbosa como tratamiento concomitantemente.

El **PERFIL 5** se caracteriza por presentar **AHOs notificados en otras posiciones de sospecha** (segunda posición o siguientes). Se observan combinaciones de un número elevado de fármacos sospechosos, siendo entre ellos casi una constante la presencia de fármacos del sistema cardiovascular combinados con diferentes AHOs. Como caso llamativo destaca la relación metformina-rivastigmina en la que se produce náuseas y pirexia.

Profundizando más, el **perfil 5.1** se caracteriza por presentar -tanto en hombres como mujeres- trastornos de la piel y del tejido subcutáneo no graves. En cambio, en el **perfil 5.2**, se observan RAs graves que ocurren mayoritariamente en hombres y que afectan al metabolismo y la nutrición, al sistema sanguíneo y linfático, y al sistema respiratorio y torácico. El **perfil 5.3** se desmarca de los anteriores por presentar menos fármacos sospechosos y ser predominante en mujeres. En este último perfil se registran RAs graves no mortales debidas a trastornos del metabolismo y la nutrición y trastornos gastrointestinales. A continuación comentamos las relaciones más relevantes observadas en este perfil 5:

Antihipertensivos y metformina. Dentro de los tratamientos antihipertensores que aparecen más relacionados con metformina, se encuentran los principios activos **enalapril** (IECA) y **valsartán** (ARA-II) pertenecientes ambos al tratamiento cardiovascular. Son agentes que ejercen su acción antihipertensora actuando en el sistema renina-angiotensina. Debido a que metformina presenta eliminación por vía renal, en su ficha técnica se recomienda tener especial cuidado en situaciones en las que la función renal pueda estar afectada como puede ser al iniciarse un tratamiento antihipertensor, diurético o con AINEs (48). En caso de llegar a una situación de insuficiencia renal podría producirse una acumulación plasmática de metformina, dando lugar a acidosis láctica (47). Es por ello que se

recomienda estimar el aclaramiento de creatinina antes de iniciarse el tratamiento con metformina y regularmente desde su inicio (1 vez al año en pacientes con función renal normal, de 2 a 4 veces en pacientes con aclaramiento de creatinina próximo al límite inferior del valor normal y en pacientes de edad avanzada) (48). También se recomienda no administrar metformina en pacientes con niveles de creatinina sérica superiores a 1,5 mg/dl en hombres o 1,4 mg/dl en mujeres (47).

Nuestros resultados demuestran la presencia de metformina y enalapril y/o valsartán (entre otros principios activos notificados) en 47 casos. En 5 de ellos aparecen ambos fármacos como sospechosos, y en 3 se presenta como RA insuficiencia renal (IR) -2 con resultado de muerte por acidosis e insuficiencia renal por lo que concuerda con las características indicadas anteriormente-. Debido a que el porcentaje de aparición de IR no es muy elevado (6%), creemos que las recomendaciones sobre el uso combinado de metformina y antihipertensivos parecen aplicarse. A su vez, si la IR se ha notificado como RA significa que no era una condición preexistente en el paciente, por lo que generaría sospecha sobre el tratamiento farmacológico, y como tal debería aparecer en la bibliografía. En los tres casos donde aparece IR el antihipertensivo implicado es enalapril.

Teniendo en cuenta la elevada proporción de mortalidad entre los casos que desarrollaron IR (preexistente o por RA), sería oportuno incluir información al respecto en el apartado de RAs de las ficha técnicas de formulaciones con metformina –además de la existente en advertencias y precauciones- (48), a semejanza de como aparece en el Catálogo de Especialidades Farmacéuticas (47); y que se valore el estudio de la potencialidad de generar IR por tratamiento con metformina y antihipertensivos en pacientes sin IR preexistente.

Rivastigmina y metformina. Relación relevante es la observada entre los principios activos metformina y rivastigmina (fármaco antidemencia), y estos, a su vez, con RAs de náuseas y pirexia. Esta combinación de fármacos aparece en 3 casos, de los cuales 2 tienen desenlace mortal. En estos casos mortales ambos principios activos, junto con otros notificados secundariamente, son considerados fármacos sospechosos.

No hemos encontrado ninguna referencia respecto a la relación entre metformina y rivastigmina (47). Debido a la gravedad de los casos en los que aparece, sería interesante estudiar esta posible interacción (o RA), en pacientes diabéticos de edad avanzada. Este hecho puede adquirir aún más relevancia con el tiempo, debido a que los pacientes diabéticos alcanzan cada vez edades más avanzadas en las que, a su vez, existe mayor incidencia de Alzheimer y Parkinson pudiendo verse afectados por estas RAs debido a su medicación con rivastigmina.

En los dos casos mortales con metformina-rivastigmina, se ha observado como RAs malestar general, náuseas y pirexia, esta triada podría utilizarse como sintomatología que precisara sobreseguimiento. Estas tres RAs notificadas aparecen en la ficha técnica de rivastigmina (89); en el caso de metformina sólo las náuseas. Aun así, las náuseas y los vómitos son RAs frecuentes observadas con rivastigmina y con metformina, especialmente durante la fase de adaptación al tratamiento. Puede darse un efecto sinérgico por parte de ambos fármacos en la aparición de estas RAs, las cuales desencadenarían estados de deshidratación aguda, situación que puede aumentar, a su vez, el riesgo de sufrir acidosis láctica (44). Hay que indicar que en ambos casos mortales también hubo uso concomitante de fármacos derivados de dihidropiridina (bloqueantes de canales de calcio con efectos cardiovasculares) y estatinas sin especificarse el principio activo.

Acenocumarol y glibenclamida. En nuestros resultados obtenemos relación entre glibenclamida -sulfonilurea- y acenocumarol -antagonista de vitamina K con acción antitrombótica-. La interacción con riesgo de hipoglucemia entre sulfonilureas y anticoagulantes orales es conocida (19, 20, 26), pudiendo llegar eventualmente a coma hipoglucémico, cuando se producen administraciones concomitantes de algunos antagonistas de la vitamina K -dicumarol, acenocumarol, warfarina- con determinadas sulfonilureas -tolbutamida/clorpropamida, clorpropamida, y glibenclamida, respectivamente- (85). En caso de tener que usarlos combinados se recomienda vigilar los parámetros de coagulación (tiempo de protrombina -TP- e International Normalized Ratio -INR-). En la ficha técnica de acenocumarol se indica que este puede potenciar el efecto hipoglucemiante de los derivados sulfoniluréticos sin especificar ninguno; así como que algunas sulfonilureas -como tolbutamida o clorpropamida- pueden, a su vez, potenciar el efecto anticoagulante del acenocumarol (90). Otros autores consideran que las interacciones asociadas con anticoagulantes orales son generalizables a las indicadas para warfarina (34).

Entre nuestros datos hay 13 casos con tratamiento de glibenclamida y acenocumarol. Sólo hay hipoglucemia en dos casos y el acenocumarol no se considera sospechoso. En cambio, en los 3 casos donde se identifican RAs hemorrágicas tanto acenocumarol como glibenclamida son considerados sospechosos por interacción.

Dado que en algunas referencias advierten de las interacciones cruzadas de determinadas sulfonilureas y anticoagulantes, mientras que en otras se hace la advertencia respecto al grupo al que pertenecen sin especificar principios activos, sería adecuado que donde se presenten sulfonilureas y acenocumarol implicados en casos con hipoglucemias, se notificase el acenocumarol como sospechoso por interacción.

Antidiabéticos y terapia preventiva cardiovascular. Según las recomendaciones internacionales, en pacientes diabéticos que presentan hipertensión, es necesaria la politerapia de 2 o más agentes antihipertensivos (IECA/ARAII, diuréticos) (91). A su vez, en caso de que los pacientes diabéticos tengan más de cuarenta años o algún factor de riesgo (hipertensión, dislipemia, riesgo cardiovascular, historia familiar de enfermedad cardiovascular, tabaquismo), se recomienda el uso de estatinas y antiagregantes plaquetarios (91).

En nuestros resultados hay 258 casos con tratamiento antihipertensivo (IECA o ARAII), de los que 13 presentan trastornos cardiovasculares como RA (5,0 %). Entre los pacientes diabéticos con tratamiento antihipertensivo, hay 82 con tratamiento hipolipemiante (estatinas), de los que 4 presentan trastornos cardiovasculares (4,8%). De los pacientes diabéticos con tratamiento antihipertensivo e hipolipemiante, 33 tienen tratamiento antiagregante, de los que 1 presenta trastorno no cardíaco (3,0%). Si además de tratamiento antidiabético, antihipertensivo, hipolipemiante y antiagregante tienen tratamiento adicional de diuréticos, nos encontramos con 9 casos donde ninguno presenta trastornos cardiovasculares.

Tras este desglose podríamos concluir que, en pacientes diabéticos, un mayor control de factores de riesgo cardiovascular parece eficaz en la reducción de aparición de RAs cardiovasculares. A su vez, este enfoque preventivo (antidiabéticos + IECA/ARAII + estatinas + antiagregantes + diuréticos) obliga a una politerapia mínima de 4-5 fármacos, que en contra de lo esperable, genera pocas RAs y, en general, no graves.

Simvastatina, hepatitis colestásica y AHOs. Observamos 2 casos donde se relacionan simvastatina y hepatitis colestásica en notificaciones de AHOs en politerapia. Simvastatina está contraindicada en hepatopatía activa o elevaciones persistentes de transaminasas séricas (85). A su vez, en su ficha técnica se recoge hepatitis como RA rara (92), aunque no se hace referencia expresa a la tipología colestásica que aparece en nuestros resultados, ni a que existan interacciones con hipoglucemiantes orales.

A pesar de ello, consideramos que un tratamiento concomitante antidiabético bien con riesgo de hepatitis reversible -como acarbose (88) o metformina (48)-, bien con riesgo de hepatitis y colestasis que puedan derivar en fallo hepático -como glibenclamida (87)- puede aumentar el riesgo de aparición o la gravedad de la hepatitis colestásica por simvastatina. De hecho, glibenclamida también aparece relacionada con hepatitis colestásica en la red de enlaces.

Fármacos no antidiabéticos y RAs en presencia de AHOs. Hemos observado correlación de hipoglucemia con gemfibrozilo y con levofloxacino, y de erupción eritematosa con irbesartán.

En el caso de gemfibrozilo, es conocido su riesgo de producir hipoglucemia si se combina con hipoglucemiantes (85) –como es el caso-; y en especial con repaglinida (93). En nuestros resultados no llega a especificarse si se produce por combinación con este último fármaco.

Respecto a levofloxacino, hay advertencias -al igual que ocurre con todas las quinolonas-, del riesgo de hipoglucemia en pacientes que reciben tratamiento concomitante con agentes hipoglucemiantes orales -como glibenclamida- o insulina (85); y aparece recogida como RA en la ficha técnica de levofloxacino (94). En nuestros resultados parece más relacionada con AHOs, sin predominio de ninguno.

En el caso de irbesartán, no se registran reacciones cutáneas en la ficha técnica del fármaco para el 2009 (85) pero sí para el 2011 (95), aunque sólo se recoge como RA rara la erupción cutánea, no se indica eritematosa. Sería interesante observar si tratamientos concomitantes con riesgo de eritema –como repaglinida (96)- pueden influir en su aparición.

COMBINACIONES DE INSULINAS Y AHOs EN POLITERAPIA

Las asociaciones obtenidas presentan frecuencias muy bajas comparadas con los grupos analizados anteriormente, lo que significa que hay una gran variabilidad entre los casos. La única asociación de fármacos que aparece más de una vez es metformina-repaglinida, quedando notificada la insulina en posiciones de menor relevancia.

En este grupo de politerapia, a semejanza de los anteriores de Insulinas y AHOs considerados por separado, se repite el predominio de hipoglucemia en su asociación con glargina o con metformina, cuando, en monoterapia, glargina se asocia con más frecuencia a hiperglucemia, y metformina por sí sola no causa hipoglucemia. Se puede deducir que la influencia de otros fármacos concomitantes es la causa de dicha hipoglucemia, y que el hecho de que glargina o metformina no aparezcan relacionadas con principios activos concretos es signo de la variedad de tratamientos que pueden estar implicados.

En cambio, aparece la relación entre pioglitazona y la RA vértigo, que aun siendo poco frecuente según se registra en su ficha técnica (97), es bastante específica de este principio activo.

En el **perfil 6.1**, metformina es el fármaco sospechoso aunque se presenta combinado con todo tipo de fármacos –insulinas, IECAs, antiagregantes- considerados no sospechosos, mientras que las RAs notificadas no son específicas de metformina.

La situación de variabilidad que comentábamos es más observable en el **perfil 6.2**. Los fármacos sospechosos pueden ser insulina glargina o metformina o

repaglinida, siendo así el único perfil de todo el estudio donde las notificaciones agrupadas no presentan elementos comunes. Esta situación, en contra de parecer una limitación del método, permite conocer que el modelo agrupa en un perfil todos los casos que considera atípicos, por lo tanto son más fácilmente identificables en caso de que ese fuese nuestro objetivo de estudio.

El **perfil 6.3**, es el único en el que se notifican insulinas y AHOs, y donde se considera más de un fármaco sospechoso. La insulina glargina destaca por ser el principal fármaco sospechoso, y la posibilidad de interacciones entre fármacos es elevada dada la variabilidad de combinaciones posibles entre antidiabéticos, analgésicos y antiinflamatorios, sedantes y anticoagulantes. A pesar de que los casos no fueron graves en su mayoría, consideramos especialmente la afectación del sistema nervioso.

A continuación comentamos las relaciones más relevantes observadas en el perfil 6:

Metformina, sulfonilurea e insulina. Resulta interesante que, en casos en los que se utiliza insulina, no se presenten metformina y sulfonilureas como los dos primeros fármacos sospechosos de RAs. Esto puede significar, por un lado, que el escalón de tratamiento basado en una terapia triple parece seguro; y contrasta con el número de casos de RAs donde la asociación metformina+sulfonilureas estaba presente sin utilizarse insulina, por lo que sería de esperar que hubiese más notificaciones al añadir esta última al tratamiento.

Por otro lado, esto puede significar que este enfoque terapéutico (metformina + sulfonilurea + insulina nocturna) no es muy utilizado, a pesar de recogerse en todos los algoritmos de tratamiento recomendados, tanto nacionales (19, 22, 25), como internacionales (76-79, 79, 98).

Si tomamos en conjunto las observaciones del perfil 6 -ausencia de RAs con uso asociado de metformina+sulfonilureas+insulina-, y las del perfil 4 -donde vemos más RAs asociadas a uso combinado de metformina y sulfonilureas o metformina y glitazonas, sin presencia de insulina-; y las contrastamos con los algoritmos de tratamiento indicados anteriormente, podemos deducir que en España se ha tendido más hacia una triple terapia con AHOs que a complementar el tratamiento de metformina o de metformina-sulfonilurea con la insulinización temprana. Este hecho se contrapone con la recomendación adicional al algoritmo de tratamiento de diabetes tipo 2 realizada por el consenso ADA/EASD -y que se mantiene actualmente-, donde se indica que aunque se pueden usar tres AHOs, el inicio y la intensificación de la terapia con insulina es preferible en términos de efectividad y gasto (76).

Esta deducción sobre la ausencia de insulinización tardía, también se apoya en los pocos casos de RAs observados donde los fármacos sospechosos principales

son metformina e insulina de acción prolongada glargina (1 caso), por lo que parece no haber sido un tratamiento muy extendido. Lo mismo ocurriría con el tratamiento insulínico intensivo combinado con metformina (1 caso de tratamiento con glulisina y metformina).

Metformina, repaglinida e insulina. Observamos notificaciones en las que se asocia metformina + repaglinida + insulina en el perfil 6 (insulinas+AHOs), mientras que en el perfil 4 (combinaciones de AHOs) no destacaba la asociación metformina-repaglinida.

Según las guías nacionales, en casos donde las sulfonilureas estén contraindicadas o si los pacientes realizan comidas irregulares puede sustituirse las sulfonilureas por glinidas (22). Estas últimas sólo son consideradas como una opción terapéutica según el consenso ADA/EASD en casos concretos debido a su menor efectividad hipoglucemiante y su coste (76). Es probable que en los casos donde las sulfonilureas se descartan, la opción de insulinización se considere antes, debido a un control glucémico deficiente con las glinidas.

Insulinas y glitazonas. Hemos observado tres casos de edema (dos periféricos y un angioedema) en los que están implicados como sospechosos **pioglitazona e insulina** (detemir, glargina o lispro-lispro protamina). La insulina detemir es la única que no se consideraba sospechosa.

Es conocido que la administración concomitante de insulina y pioglitazona, ambas asociadas con la retención hídrica, puede aumentar el riesgo de edema y dicha situación exacerbar o precipitar la insuficiencia cardiaca (41, 97).

Según la ficha técnica de pioglitazona, su uso requiere un seguimiento de signos y síntomas de insuficiencia cardiaca, aumento de peso o edema; tanto en pacientes con al menos un factor de riesgo como en pacientes que combinen pioglitazona e insulina (97). Las mismas advertencias respecto al riesgo de insuficiencia cardiaca por dicho tratamiento combinado se recogen en la ficha técnica de insulina detemir (41).

Algunos autores incluso consideran contraindicado el uso de pioglitazona en combinación con insulina en cualquier circunstancia tras ocurrir casos de fallo cardiaco en presencia de esta combinación (85).

También observamos dos notificaciones de insuficiencia cardiaca en las que aparecen **rosiglitazona e insulina** (aspart-aspart protamina o glargina). De las dos insulinas, únicamente glargina se considera sospechosa por interacción - aunque en su ficha técnica sólo se recoge el riesgo de insuficiencia cardiaca con pioglitazona, no con rosiglitazona (69)-; mientras que aspart-aspart protamina - con idénticas indicaciones (99)- no se considera sospechosa por interacción en nuestros datos.

Debido a lo anterior, en los casos donde se notifica edema y los pacientes están tratados con glitazonas e insulina, estas últimas deberían registrarse siempre como sospechosas o sospechosas por interacción, y los pacientes deberían sobreseguirse por su posible riesgo de insuficiencia cardiaca.

Glimepirida, acarbosa e insulina. Hay dos casos de hipoglucemia y asociación de glimepirida y acarbosa como fármacos sospechosos, y exclusivamente en uno de ellos aparece también insulina como sospechosa. Sólo se advierte del riesgo hipoglucemiante de esta asociación en la ficha técnica de acarbosa (88) pero no en la de glimepirida explícitamente (100), a semejanza de lo que ya indicamos en el caso de glibenclamida y acarbosa.

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Respecto a los resultados en casos de politerapia, al ajustar el modelo a tres perfiles por grupo, cada perfil está constituido por un número elevado de casos, y las observaciones que se derivan de ellos son más inespecíficas que en los perfiles de monoterapia. Hemos comprobado que si se permite que el modelo adapte los datos a tantos perfiles como fuesen necesarios se obtienen resultados mucho más específicos aunque desproporcionadamente amplios para su tratamiento detallado en el presente trabajo.

7. CONCLUSIONES

En monoterapia:

- los casos de hiperglucemia asociada a los análogos de insulina corresponderían a disminuciones del nivel de insulina, no a hiperglucemias de rebote;
- los análogos de acción prolongada producirían más reacciones en la zona de inyección por una administración inadecuada;
- la diarrea y acidosis láctica por metformina predominaron en Aragón y Cataluña, respectivamente, en mujeres mayores de 65 años; estas RAs parecen limitar el uso de metformina en España;
- en Galicia existe una posible infrautilización de metformina frente a sulfonilureas; los pacientes -mujeres entre 65 y 74 años- suelen presentar hipoglucemias no graves;
- la detección de anemia en monoterapia con rosiglitazona podría haber facilitado la identificación de pacientes en riesgo de sufrir resultados clínicos adversos.

En politerapia:

- existe un posible uso incorrecto de insulina lispro combinada con insulinas intermedias (isofánica) o bifásicas (lispro+lispro protamina);

- la administración por separado de metformina y glitazonas parece ser más segura;
- existe riesgo de aparición de insuficiencia renal con metformina y antihipertensivos;
- puede producirse hepatitis colestásica por simvastatina en presencia de acarbosa, metformina o glibenclamida;
- existe un posible efecto sinérgico de metformina y rivastigmina en la producción de náuseas y pirexia en pacientes diabéticos de edad avanzada;
- sólo en politerapia se observaron asociaciones de glargina-shock hipoglucémico, metformina-hipoglucemia y metformina-acidosis (no láctica);
- fueron más frecuentes las RAs a rosiglitazona/metformina en mujeres y a pioglitazona/metformina en hombres;
- la terapia cardiovascular parece segura y eficaz en la reducción de aparición de RAs cardiovasculares en pacientes diabéticos;
- en España se tiende hacia una triple terapia con AHOs con más riesgo de producir RAs, en vez de complementar el tratamiento de metformina o de metformina-sulfonilurea con la insulinización temprana.

El modelo aplicado ha demostrado ser válido para detectar tanto características comunes entre los casos como casos atípicos. La obtención de perfiles de pacientes diabéticos que sufren reacciones adversas a medicamentos presenta aplicaciones para prever acontecimientos en el seguimiento post-comercialización de fármacos tanto tradicionales como nuevos.

8. AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo.

9. REFERENCIAS

1. Carvajal A.: Introducción a la Farmacoepidemiología: Concepto, Historia, Métodos y Fuentes de Datos. En *Farmacoepidemiología*; Carvajal A, ed.; Secretariado de Publicaciones, Universidad de Valladolid; Valladolid, 1993; p 11-24.
2. Sánchez A, García A, Carvajal A.: Notificación voluntaria de reacciones adversas a los medicamentos. En *Farmacoepidemiología*; Carvajal A, ed.; Secretariado de Publicaciones, Universidad de Valladolid; Valladolid, 1993; p 61-74.
3. Lindquist M, Edwards IR, Bate A, et al. From association to alert--a revised approach to international signal analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 8 Suppl 1, S15-S25 (1999).
4. Capellà D, Laporte JR.: La notificación espontánea de reacciones adversas a medicamentos. En *Principios de epidemiología del medicamento*; Laporte JR, Tognoni G, eds.; Masson-Salvat Medicina; Barcelona, 1983; p 147-70.
5. Manso G, Hidalgo A, Carvajal A, et al., editores. Los primeros 25 años del Sistema Español de Farmacovigilancia de Medicamentos de Uso Humano. Oviedo: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo, 2010.
6. Fornos JA, Fernández M, García P, et al. Análisis de la utilización de medicamentos por pacientes diabéticos en la provincia de Pontevedra. *Av Diabetol* 26, 47-52 (2010).

7. Sender Palacios MJ, Vernet VM, Larrosa SP, et al. Características sociodemográficas y clínicas de una población de pacientes con diabetes mellitus. *Aten Primaria* 29, 474-80 (2002).
8. Madurga M, Lázaro F, Martín-Serrano G, et al.: El Sistema Español de Farmacovigilancia de Medicamentos de Uso Humano: su historia en cifras. En *Los primeros 25 años del Sistema Español de Farmacovigilancia de Medicamentos de Uso Humano*; Manso G, Hidalgo A, Carvajal A et al., eds.; Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo; Oviedo, 2010; p 31-46.
9. Instituto de Información Sanitaria. Ministerio de Sanidad y Política Social. Notificación de reacciones adversas a medicamentos por cada 1.000 habitantes. Base de datos de Indicadores Clave del Sistema Nacional de Salud (INCLASNS-BD). [acceso 12.12.2011]. Disponible en: http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/inclasSNS_DB.htm
10. SPSS Inc.: Understanding Data Mining. En *SPSS Clementine ® 12.0 User's Guide*; SPSS Inc; Chicago, IL, 2007; p 33-45.
11. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Norwegian Institute of Public Health. ATC. Structure and principles [acceso 12.02.2010]. Disponible en: http://www.whocc.no/atc/structure_and_principles/
12. Sistema Español de Farmacovigilancia de Medicamentos de Uso Humano. Base de datos FEDRA (Farmacovigilancia Española, Datos de Reacciones Adversas) 2000-2008. Agencia Española del Medicamento.
13. División de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia. Subdirección General de Seguridad de Medicamentos, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Aceptación de los Criterios y Normas de utilización de los datos de la base de datos FEDRA del Sistema Español de Farmacovigilancia: SEFV/1/CT y SEFV/2/CT.
14. División de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia. Subdirección General de Seguridad de Medicamentos, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Criterios para la utilización de los datos de la base de datos FEDRA del Sistema Español de Farmacovigilancia (SEFV/1/CT).
15. División de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia. Subdirección General de Seguridad de Medicamentos, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Normas para la correcta interpretación y utilización de los datos del Sistema Español de Farmacovigilancia (SEFV/2/CT).
16. Instituto Nacional de Estadística (INE). Encuesta Nacional de Salud 2006 [acceso 03.02.2010]. Disponible en: <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p419&file=inebase&L=0>
17. International Conference on Harmonisation (ICH). MedDRA ® Term Selection: Points to consider. ICH-Endorsed Guide for MedDRA Users [acceso 03.04.2011]. Disponible en: http://www.meddrasso.com/files_acrobat/ptc/9491-1310_TermSelPTC_R4.0_sep2010.pdf
18. Carvajal A, Montero D. MedDRA: una terminología para la armonización en materia de medicamentos. *ICB digital* 10, 1-4 (2002).
19. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos., editores. Plan Estratégico para el desarrollo de la Atención Farmacéutica '10. Guía de Atención Farmacéutica al paciente diabético. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2010.
20. Murillo MD, Fernández-Llimós F, Tuneu L, editores. Guía de seguimiento farmacoterapéutico sobre diabetes. Granada: Espai Gràfic Anagrafic, S.L, 2004.
21. Menéndez E, Lafita J, Artola S, et al. Recomendaciones para el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2. Documento de consenso. *Av Diabetol* 26, 331-8 (2010).
22. Grupo de Trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2, editores. Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2. Madrid: Plan Nacional para el SNS del MSC. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco: 2008.
23. Sociedad Española de Diabetes. Guías de práctica clínica: FMC - Protocolo DM2 en AP (2000) [acceso 12.08.2010]. Disponible en: <http://www.sediabetes.org/gestor/upload/file/00003582archivo.pdf>
24. Franch J, Goday A, Mata M. Proyecto COMBO. Actualización 2004. Criterios y pautas de terapia combinada en la diabetes tipo 2. *Av Diabetol* 20, 77-112 (2004).

25. del Olmo González E, Carrillo Pérez M, Aguilera Gumpert S. Actualización del tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2. *Inf Ter Sis Nac Salud* 32, 3-16 (2008).
26. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. Madrid: Colegio de Farmacéuticos; 1998-2009.
27. Lázaro Bengoa E. Manual de usuario FEDRA ® 2.0 (Alta de notificaciones).
28. Matute P, Merello J, Lara R, editores. Curso de farmacovigilancia para profesionales sanitarios. Medical Dynamics, 2003.
29. Chang M.: Data mining and Signal Detection. En *Modern Issues and Methods in Biostatistics. Statistics for Biology and Health.*; Gail M, Krickeberg K, Samet J et al., eds.; Springer; New York, 2011; p 205-32.
30. SPSS Inc.: Graph Nodes. En *SPSS Clementine ® 12.0 Source, Process, and Output Nodes*; SPSS Inc; Chicago, IL, 2007; p 173-273.
31. SPSS Inc.: Clustering Models. En *SPSS Clementine ® 12.0 Modeling Nodes*; SPSS Inc; Chicago, IL, 2007; p 254-83.
32. SPSS Inc.: Kohonen Algorithms. En *SPSS Clementine ® 12.0 Algorithms Guide*; SPSS Inc; Chicago, IL, 2007; p 67-71.
33. Kohonen T. Self-organizing neural projections. *Neural Netw* 19, 723-33 (2006).
34. Martindale: The complete drug reference. London: Pharmaceutical Press, 2009.
35. Massi BM, Humburg E, Dressler A, et al. A one-year, randomised, multicentre trial comparing insulin glargine with NPH insulin in combination with oral agents in patients with type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 35, 189-96 (2003).
36. Carroll MF, Schade DS. The dawn phenomenon revisited: implications for diabetes therapy. *Endocr Pract* 11, 55-64 (2005).
37. Rybicka M, Krysiak R, Okopien B. The dawn phenomenon and the Somogyi effect - two phenomena of morning hyperglycaemia. *Endokrynol Pol* 62, 276-84 (2011).
38. Ceruelo-Bermejo J, Miranda-Hidalgo R, García-Ortiz A, et al. Insulina detemir. Hoja Informativa de Medicamentos-Sacylime 1, 1-2 (2005).
39. CADIME, EASP. Insulina glargina (DCI). Ficha de novedad terapéutica 1-2 (2006).
40. CADIME, EASP. Insulina detemir (DCI). Ficha de novedad terapéutica 1-2 (2006).
41. European Medicines Agency (EMA). Levemir®: EPAR-Product information [acceso 10.01.2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000528/WC500036662.pdf
42. Torlone E, Di CG, Mannino D, et al. Insulin analogs and pregnancy: an update. *Acta Diabetol* 46, 163-72 (2009).
43. International Diabetes Federation, editores. IDF Diabetes Atlas. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2006.
44. Spiller HA, Sawyer TS. Toxicology of oral antidiabetic medications. *Am J Health Syst Pharm* 63, 929-38 (2006).
45. Comisión de Farmacia y Terapéutica del Hospital Alarcos (Ciudad Real). Alerta sobre seguridad de metformina: riesgo grave de acidosis láctica [acceso 20.06.2007]. Disponible en: http://sescam.jccm.es/web1/profesionales/farmacia/usoRacional/documentos/VI_05_RiesgoGraveAcidosisLactica.pdf
46. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 352, 854-65 (1998).
47. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. Madrid: Colegio de Farmacéuticos; 2009.
48. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Dianben 850mg®. Ficha técnica [acceso 24.02.2012]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=55211&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>
49. Redondo Capafons S, Garriga Riosca MR, Pla Poblador R. Seguimiento de la utilización de metformina en la población de riesgo. *Farm Hosp* 29, 364-6 (2005).
50. Hirst JA, Farmer AJ, Ali R, et al. Quantifying the effect of metformin treatment and dose on glycaemic control. *Diabetes Care* 35, 446-54 (2012).
51. El-Hennawy AS, Jacob S, Mahmood AK. Metformin-associated lactic acidosis precipitated by diarrhea. *Am J Ther* 14, 403-5 (2007).

52. Holstein A, Plaschke A, Egberts EH. Lower incidence of severe hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes treated with glimepiride versus glibenclamide. *Diabetes Metab Res Rev* 17, 467-73 (2001).
53. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. A10BB. Sulfonilureas y productos relacionados. Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. Madrid, Consejo de Farmacéuticos; 2008. p.407.
54. Elizondo-López-de-Landache I, Bracerías-Izaguirre L. Evolución de datos de consumo de antidiabéticos orales correspondientes al grupo terapéutico A10B a través de receta médica oficial en la Comunidad Autónoma del País Vasco en el periodo 2000-octubre 2007. *Gac Med Bilbao* 106, 41-3 (2009).
55. McIntosh A, Hutchinson A, Home PD, et al., editores. Clinical guidelines and evidence review for Type 2 diabetes: management of blood glucose. Sheffield: SCHARR, University of Sheffield. 2001.
56. Cano Blanquer D, San Martín Ciges MD. Utilización de antidiabéticos en un área de salud urbana y otra rural de la provincia de Valencia. *FAP* 3, 105-17 (2005).
57. Reimundez G and Real M. El estudio ADVANCE, el más amplio realizado hasta ahora en diabéticos Tipo 2, muestra que el control intensivo de la glucosa reduce en un 10% las complicaciones macro y microvasculares asociadas a esta patología. Nota de prensa. Disponible en: http://www.accesomedia.com/display_release.html?id=47178
58. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 358, 2560-72 (2008).
59. Shvidel L, Arcavi L, Sigler E. Symptomatic anemia induced by rosiglitazone. *Eur J Intern Med* 18, 348 (2007).
60. European Medicines Agency (EMA). Avandia®: EPAR-Product information [acceso 10.01.2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000268/WC500029108.pdf
61. Thomas MC, Cooper ME, Rossing K, et al. Anaemia in diabetes: Is there a rationale to TREAT? *Diabetologia* 49, 1151-7 (2006).
62. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329, 977-86 (1993).
63. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352, 837-53 (1998).
64. DeWitt DE, Hirsch IB. Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review. *JAMA* 289, 2254-64 (2003).
65. CADIME - Escuela Andaluza de Salud Pública. Nuevas insulinas. *Boletín Terapéutico Andaluz* 22, 17-9 (2006).
66. Martin CL, Albers J, Herman WH, et al. Neuropathy among the diabetes control and complications trial cohort 8 years after trial completion. *Diabetes Care* 29, 340-4 (2006).
67. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2008. *Diabetes Care* 31 Suppl 1, S12-S54 (2008).
68. Cengiz E, Swan KL, Tamborlane WV, et al. The Alteration of Aspart Insulin Pharmacodynamics When Mixed With Detemir Insulin. *Diabetes Care* (2012).
69. European Medicines Agency (EMA). Lantus®: EPAR-Product information [acceso 03.01.2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000284/WC500036082.pdf
70. European Medicines Agency (EMA). Novorapid®: EPAR-Product information [acceso 10.01.2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000258/WC500030372.pdf
71. European Medicines Agency (EMA). Humalog®: EPAR-Product information [acceso 10.10.2011]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000088/WC500050332.pdf

72. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Norwegian Institute of Public Health. ATC/DDD Index [acceso 16.03.2011]. Disponible en: http://www.whocc.no/atc_ddd_index/
73. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Norwegian Institute of Public Health. List of DDDs combined products [acceso 20.05.2011]. Disponible en: http://www.whocc.no/ddd/list_of_ddd_combined_products/
74. Monami M, Luzzi C, Lamanna C, et al. Three-year mortality in diabetic patients treated with different combinations of insulin secretagogues and metformin. *Diabetes Metab Res Rev* 22, 477-82 (2006).
75. Gonzalez-Ortiz M, Guerrero-Romero JF, Violante-Ortiz R, et al. Efficacy of glimepiride/metformin combination versus glibenclamide/metformin in patients with uncontrolled type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 23, 376-9 (2009).
76. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 29, 1963-72 (2006).
77. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: update regarding thiazolidinediones: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 31, 173-5 (2008).
78. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 32, 193-203 (2009).
79. National Collaborating Centre for Chronic Conditions, editores. Type 2 diabetes: national clinical guideline for management in primary and secondary care (update). London: Royal College of Physicians, 2008.
80. Schier JG, Hoffman RS, Nelson LS. Metformin-induced acidosis due to a warfarin adverse drug event. *Ann Pharmacother* 37, 1145 (2003).
81. Gomes T, Juurlink DN, Lipscombe LL, et al. Clinical and demographic characteristics of patients receiving different oral hypoglycemic agents. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 18, 756-60 (2009).
82. Fornos JA, Patricia García G, Fernández M, et al. Evaluación del conocimiento, el cumplimiento y la satisfacción del tratamiento en pacientes diabéticos en la oficina de farmacia. *Av Diabetol* 24, 399-406 (2008).
83. Instituto Nacional de Estadística (INE). Mujeres y hombres en España 2008-2010 [acceso 03.10.2011]. Disponible en: http://www.ine.es/ss/Satellite?L=es_ES&c=INEPublicacion_C&cid=1259924822888&p=1254735110672&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout&titema=Sociedad
84. Dilla T, Costi M, Boye KS, et al. El impacto de la obesidad en el manejo y evolución de la diabetes mellitus. *Rev Clin Esp* 208, 437-43 (2008).
85. UBM Medica. Vademecum de medicamentos, sustancias, principios activos, dopaje, interacciones, equivalencias internacionales y laboratorios farmacéuticos de España [acceso 14.12.2011]. Disponible en: <http://www.vademecum.es/>
86. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Acetensil®. Ficha técnica [acceso 24.12.2011]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=58116&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>
87. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Daonil®. Ficha técnica [acceso 24.12.2011]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=48545&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>
88. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Glucobay®. Ficha técnica [acceso 24.02.2012]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=59420&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>
89. European Medicines Agency (EMA). Exelon®: EPAR-Product information [acceso 10.01.2012]. Disponible en:

- http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000169/WC500032598.pdf
90. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Sintrom®. Ficha técnica [acceso 24.12.2011]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=58994&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>
 91. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2009. Diabetes Care 32 Suppl 1, S13-S61 (2009).
 92. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Zocor®. Ficha técnica [acceso 24.02.2012]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=58846&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>
 93. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Nota informativa 2003/07. Contraindicación del uso concomitante de repaglinida y gemfibrozilo [acceso 05.06.2008]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2003/NI_2003-07_repaglinida-gemfibrozilo.htm
 94. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Tavanic®. Ficha técnica [acceso 24.02.2012]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=62065&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>
 95. European Medicines Agency (EMA). Aprovel®: EPAR-Product information [acceso 10.01.2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000141/WC500025752.pdf
 96. European Medicines Agency (EMA). Novonorm®: EPAR-Product information [acceso 10.01.2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000187/WC500029905.pdf
 97. European Medicines Agency (EMA). Actos®: EPAR-Product information [acceso 10.01.2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000285/WC500021386.pdf
 98. Sibal L, Home PD. Management of type 2 diabetes: NICE guidelines. Clin Med 9, 353-7 (2009).
 99. European Medicines Agency (EMA). Novomix®: EPAR-Product information [acceso 10.01.2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000308/WC500029441.pdf
 100. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Amaryl®. Ficha técnica [acceso 24.12.2011]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=61409&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>

APÉNDICE**1a. Análisis de red de enlaces. Frecuencias de correlación en monoterapia**

GRUPO	principio activo	término preferente RAM	nº de enlaces
<i>GRUPO 1. Notificaciones con Insulina en monoterapia</i>	A10AD05	Hiperglucemia	7
	A10AE05	Reacción en la zona de inyección	5
	A10AC01	Hipoglucemia	5
	A10AE04	Hiperglucemia	5
	A10AE05	Erupción eritematosa	3
	A10AE04	Hipoglucemia	3
	A10AE04	Reacción en la zona de inyección	3
	A10AD05	Respuesta terapéutica disminuida	3
	A10AD01	Hiperglucemia	2
	A10AE04	Erupción eritematosa	2
	A10AD05	Prurito	2
	A10AE04	Diabetes mellitus	2
	A10AC01	Hiperglucemia	2
<i>GRUPO 2. Notificaciones con AHO en monoterapia</i>	A10BA02	Diarrea	60
	A10BA02	Acidosis láctica	28
	A10BB01	Hipoglucemia	20
	A10BA02	Dolor abdominal	11
	A10BA02	Dispepsia	10
	A10BA02	Náuseas	10
	A10BB12	Hipoglucemia	9
	A10BG02	Anemia	6
	A10BF01	Diarrea	6
	A10BA02	Mareo	6

1b. Análisis de red de enlaces. Frecuencias de correlación en politerapia

GRUPO	principio activo sospechoso posición 1	principio activo sospechoso posición 2	término preferente RAM posición 1	término preferente RAM posición 2	nº de enlaces
<i>GRUPO 3. Notificaciones con Insulina/sy principios activos no antidiabéticos</i>	A10AE05	A10AB05	-	-	3
	A10AC01	-	Hipoglucemia	-	2
	A10AD04	A10AB04	-	-	2
	A10AE04	-	Shock hipoglucémico	-	2
	A10AB04	A10AC01	-	-	2
	C09CA04	C03AA03	-	-	2
<i>GRUPO 4. Notificaciones con AHO/sy principios activos no antidiabéticos. AHO en primera posición</i>	A10BA02	A10BB01	-	-	11
	A10BB01	-	Hipoglucemia	-	11
	A10BA02	-	Diarrea	-	11
	A10BB01	A10BA02	-	-	9
	-	A10BA02	Hipoglucemia	-	8

	A10BA02	-	Hipoglucemia	-	8
	A10BA02	-	Acidosis láctica	-	7
	-	A10BB01	Hipoglucemia	-	7
	A10BA02	A10BB12	-	-	4
	A10BG03	A10BA02	-	-	3
	A10BG02	A10BA02	-	-	3
	A10BB12	-	Hipoglucemia	-	3
	-	A10BB12	Hipoglucemia	-	3
	A10BB01	C09AA02	-	-	3
	A10BA02	-	-	Acidosis	3
<i>GRUPO 5. Notificaciones con AHO/s y principios activos no antidiabéticos. Principio activo no antidiabético en primera posición</i>	-	A10BB01	Hipoglucemia	-	5
	B01AA07	A10BB01	-	-	4
	-	A10BA02	-	Náuseas	3
	C09AA02	A10BA02	-	-	3
	C10AB04	-	Hipoglucemia	-	3
	-	A10BB01	Hepatitis colestásica	-	2
	C09CA03	A10BA02	-	-	2
	C09CA04	-	Erupción eritematosa	-	2
	C10AA01	-	Hepatitis colestásica	-	2
	J01MA12	-	Hipoglucemia	-	2
	N06DA03	A10BA02	-	-	2
	N06DA03	-	Pirexia	-	2
	N06DA03	-	-	Náuseas	2
	-	A10BA02	Pirexia	-	2
	-	-	Pirexia	Náuseas	2
<i>GRUPO 6: Notificaciones con combinaciones de Insulina/s y AHO/s</i>	A10BA02	A10BX02	-	-	2
	-	A10BA02	Hipoglucemia	-	2
	A10AE04	-	Hipoglucemia	-	2
	A10BG03	-	Vértigo	-	2

2. Ejemplo de ficha-resumen estructurada. Información obtenida para el perfil 1.1:

PERFIL 1.1			
DATOS DE LA NOTIFICACIÓN			
52 notificaciones x=0, y=0	Género:	mujer -> 59,62%	Gravedad: no -> 100%
	Edad (años):	≥ 75 -> 21,15%	Mortal: -
	CCAA:	Cataluña -> 17,31%	
	Año:	2006 -> 23,08%	
PRINCIPIOS ACTIVOS (PAs)			
PA1	ATC 4:	A10AE -> 40,38%	
	ATC 5:	A10AE05 -> 26,92%	
	Sospecha:	sospechoso -> 100%	
	Indicación terapéutica:	Diabetes mellitus -> 67,31%	
REACCIONES ADVERSAS (RAMs)			
RAM1	Órgano	Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración -> 36,54%	
RAM2	Órgano	Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo, Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración -> 31,58%	
	HltRAM	Pruritus NCOC -> 15,79%	
RAM3	Órgano	Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo -> 60%	
	HltRAM	Pruritus NCOC -> 40%	
	PtRAM	Prurito -> 40%	
RELACIÓN CAUSAL- Algoritmo de Karch y Lasagna:			5-8 probable -> 63,46%

Papel del tejido adiposo blanco, marrón y perivascular en las complicaciones vasculares asociadas a la obesidad

Almudena Gómez-Hernández^{1,2,3}, Liliana Perdomo^{1,2}, Óscar Escribano^{1,2}, Manuel Benito^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (IdISSC), España.

²CIBER de Diabetes Enfermedades Metabólicas relacionadas, España

³**Corresponding author:** Almudena Gómez-Hernández, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (IdISSC), España, Madrid-28040, Spain. Phone: 34-91-3941853; Fax: 34-91-3941779

e-mail: almudenagomez@farm.ucm.es

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 2 (2014), pag. 322-346

RESUMEN

En esta revisión se valora la contribución del tejido adiposo blanco, marrón y perivascular a la fisiopatología de las complicaciones metabólicas y vasculares asociadas a la obesidad. Para combatir la obesidad y evitar las crecientes complicaciones metabólicas y vasculares, además de los tratamientos establecidos, hay que avanzar en el conocimiento del tejido adiposo marrón y su prometedor potencial terapéutico. Dada la capacidad del tejido adiposo marrón en el gasto energético y los efectos sobre el metabolismo lipídico y glucídico, así como su potencial resistencia a la inflamación junto con el tejido adiposo perivascular; las nuevas perspectivas del tratamiento de la obesidad podrían centrarse en el diseño de nuevos fármacos o distintos regímenes o terapias que incrementen la cantidad y función del tejido adiposo marrón no sólo para luchar contra la obesidad sino también para prevenir la diabetes tipo 2 y otros desórdenes metabólicos y vasculares asociados a la misma.

Palabras clave: Obesidad; Tejido adiposo marrón; Tejido adiposo blanco; Complicaciones vasculares.

ABSTRACT

This review analyzes the contribution of white, brown and perivascular adipose tissues to the pathophysiology of metabolic and vascular complications associated

to obesity. To combat obesity and prevent its metabolic and vascular complications of high prevalence, in addition to conventional treatments a new insight in our knowledge of role of brown adipose tissue thermogenic function and its promising therapeutic potential in humans is much needed. Owing to the impact of brown adipose tissue on energy expenditure related to lipid and glucose metabolisms, as well as its potential resistance against inflammation together to perivascular adipose tissue, new perspectives in the obesity treatment might be focused in the design of new drugs, or different regimens or therapies, that increase the amount and activity of brown adipose tissue. These new treatments not only may contribute to combat obesity, but also prevent complications such as type 2 diabetes and other associated metabolic and vascular alterations.

Keywords: Obesity; Brown adipose tissue; White adipose tissue; Vascular complications.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial que ha aumentado de forma considerable en los países desarrollados en las últimas décadas, siendo en la actualidad una epidemia mundial (1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera obesos a aquellas personas que tengan un índice de masa corporal (IMC) superior a 30 kg/m² y ha estimado que en el 2015 habrá 2300 millones de adultos con sobrepeso y 700 millones de obesos. Además está aumentando de forma preocupante la obesidad infantil y así en 2010, alrededor de 40 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso (2). La obesidad se ha convertido en un problema de salud pública no sólo por el aumento de la estigmatización social, el problema económico que supone o el fallo en la calidad de vida, sino también por el riesgo asociado que presentan dichos pacientes a desarrollar otras patologías como la diabetes tipo 2, dislipidemias, hígado graso, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer, enfermedades óseas y con frecuencia algunos tipos de cánceres especialmente digestivos. Esto ocurre, al menos en parte, como resultado de la resistencia a la insulina inducida por la obesidad y el hecho de que el tejido adiposo no sólo sirve como reservorio de energía sino como un órgano endocrino secretor de hormonas, citoquinas y proteínas que afectan a la funcionalidad de las células y tejidos a lo largo de todo el organismo (3).

La obesidad se acompaña de un riesgo cardiovascular elevado por la coexistencia de otros factores de riesgo, particularmente dislipemia, hipertensión, insulinoresistencia y diabetes (4). De hecho, estos factores de riesgo están íntimamente ligados a un exceso de tejido adiposo, y más específicamente a una particular distribución corporal del mismo. Esta forma de distribución de la grasa

en el obeso sí está claramente relacionada de manera independiente con la morbimortalidad cardiovascular a través de un síndrome metabólico aterogénico (5). Éste es el motivo por el que adquiere especial trascendencia clínica la medida, no sólo de la cuantía total de la grasa corporal, sino de su distribución, habida cuenta que tal distribución tiene más impacto en el riesgo cardiovascular que la obesidad por sí misma.

Una de las alteraciones metabólicas más deletéreas de la obesidad es la dislipemia que con frecuencia la acompaña y resulta altamente aterogénica (6). Su patrón fenotípico habitual es la hipertrigliceridemia preprandial, la hiperlipidemia no HDL postprandial, el aumento real en la producción de partículas densas y pequeñas de LDL, así como la baja producción de colesterol HDL.

En mamíferos el tejido adiposo está compuesto al menos por dos tipos muy distintas de grasas como son el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo marrón o pardo (BAT) que presentan diferencias en cuanto a su morfología, distribución, genes y función. El tejido adiposo blanco es el principal reservorio de energía y libera un gran número de hormonas y citoquinas que modulan el metabolismo del organismo y la resistencia a la insulina (7-10). El desarrollo de la obesidad no sólo depende del balance entre la ingesta y el gasto energético sino también del balance entre el tejido adiposo blanco, como principal reservorio energético, y el tejido adiposo marrón, especializado en el gasto energético en forma de termogénesis a través de la proteína mitocondrial desacoplante 1 (UCP-1). Además el BAT podría afectar al metabolismo del organismo y alterar la sensibilidad a la insulina (11, 12) al igual que modificar la susceptibilidad a desarrollar obesidad (13).

2. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN LA OBESIDAD Y SUS COMPLICACIONES METABÓLICAS Y VASCULARES ASOCIADAS

2.1. Morfología y distribución del WAT. Implicación en el riesgo cardiovascular

El adipocito del WAT tiene una forma variable, aunque clásicamente es esférica de tamaño entre 25-200 μm . Además, tiene un núcleo periférico y plano y un citoplasma delgado que contiene una única gota lipídica grande que ocupa el 90% del volumen. Presenta escasas mitocondrias y un pequeño retículo endoplasmático liso y rugoso. WAT se compone de los adipocitos que se mantienen unidos por un tejido conectivo laxo que está adecuadamente vascularizado e innervado (14). Además de los adipocitos, WAT contiene macrófagos, leucocitos, fibroblastos, adipocitos, las células progenitoras y células endoteliales. La presencia de los fibroblastos, los macrófagos, y otros leucocitos, junto con los adipocitos, da cuenta de la gran variedad de proteínas que son secretadas por WAT bajo condiciones variables. El tejido adiposo blanco está distribuido a lo largo de

todo el organismo y tiene diferentes compartimentos que varían en cuanto al tamaño celular del adipocito (15, 16) a la actividad metabólica y a su papel potencial en la resistencia a la insulina y otras complicaciones vasculares asociadas a la obesidad (17, 18). En humanos, se diferencian dos depósitos principales de tejido adiposo blanco: el depósito subcutáneo correspondiente al tejido adiposo que se localiza bajo la piel, y el depósito visceral. Hay dos tipos de tejido adiposo visceral: el mesentérico y el omental (19). El primero se encuentra envolviendo al intestino, el segundo se extiende desde la parte inferior del estómago, recubriendo el abdomen y es el que normalmente se emplea en el estudio de la grasa visceral. Hace tiempo que se sabe que el tejido adiposo visceral y el subcutáneo presentan numerosas diferencias anatómicas, celulares y moleculares (20, 21); por ejemplo, la irrigación de ambos tejidos es diferente (22), y los niveles de RNA mensajero (mRNA) de leptina en el tejido adiposo subcutáneo están incrementados respecto del visceral (20). Estos tejidos también son diferentes en cuanto a la capacidad de movilización de ácidos grasos, la grasa omental es más sensible a los efectos lipolíticos de las catecolaminas y menos sensible a los efectos antilipolíticos de la insulina; por tanto, este tejido tiene una mayor capacidad de movilización de ácidos grasos que el depósito subcutáneo (22, 23). Adicionalmente hay descritas numerosas diferencias entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo referentes a la secreción de adipoquinas (24). En este sentido, una obesidad periférica se caracteriza por una acumulación de tejido adiposo subcutáneo y es más frecuente en mujeres. Este tipo de obesidad no se ha asociado a un mayor riesgo de sufrir patologías asociadas (25). Sin embargo, la obesidad central o abdominal es más frecuente en hombres y consiste en una acumulación de tejido adiposo visceral. Este tipo de obesidad se ha asociado, mediante estudios epidemiológicos, con un mayor riesgo de sufrir enfermedades tales como resistencia a la insulina, diabetes de tipo II e hipertensión, aumentando considerablemente el riesgo cardiovascular (26).

2.2. El WAT como reservorio de energía

En primer lugar, el tejido adiposo blanco es un órgano que constituye el mayor reservorio energético del organismo. La energía es almacenada en los adipocitos en forma de triglicéridos. La principal fuente de triglicéridos procede de los quilomicrones y las proteínas de muy baja densidad (VLDL) circulantes. En los humanos, el almacenamiento de los ácidos grasos en el tejido adiposo depende prácticamente de la liberación de los mismos desde las lipoproteínas por acción de la lipoproteína lipasa (LPL) (27). Tal es el protagonismo de esta enzima en el metabolismo lipídico, que se describe una acción proaterogénica de la LPL, expresada por el macrófago, y una acción antiaterogénica de la LPL, expresada en el tejido adiposo y músculo. Por tanto, esta enzima estaría implicada en las alteraciones lipídicas de la obesidad (28). Su actividad aumenta en el período

pospandrial y se inhibe en el ayuno y está incrementada en el tejido adiposo tanto de humanos como de animales de experimentación obesos (29-34). Sin embargo, la capacidad de respuesta de la LPL a la insulina y a la alimentación en pacientes obesos está disminuida (32, 35).

Otro de los procesos metabólicos que se producen en el tejido adiposo es la lipólisis, donde los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados a ácidos grasos y glicerol. El paso limitante de la lipólisis está controlado por la lipasa sensible a hormonas (HSL). Dicha hormona presenta una intensa regulación. Así, la activación de los receptores β adrenérgicos produce un aumento de los niveles intracelulares de AMPc y estimula la fosforilación activadora (P-Ser 552), catalizada por la proteína quinasa activada por AMPc (PKA) de la HSL (36). Sin embargo, la activación de los receptores α_2 adrenérgicos, favorece la reducción de los niveles intracelulares de AMPc, produciendo una menor activación de PKA y por tanto, de HSL. Así, las catecolaminas tienen un efecto dual sobre la lipólisis, y su efecto neto depende del balance entre los receptores α_2 y β adrenérgicos. Otra de las hormonas inhibitoras de la lipólisis, es la insulina, que induce la activación de PI3K y de la fosfodiesterasa III, que a su vez produce la inactivación de AMPc. En adipocitos de pacientes obesos, la lipólisis basal está aumentada y falla la lipólisis estimulada por catecolamina además de existir un descenso en la expresión de HSL (37). Se ha descrito que alteraciones en la lipólisis inducidas por catecolaminas puede tener un papel importante en el desarrollo de la obesidad en humanos, así como sus complicaciones metabólicas y vasculares asociadas. La capacidad lipolítica parece tener un componente hereditario, aunque también puede verse afectada por el propio sobrepeso y por el grado de actividad física (38). Asimismo, se ha descrito defectos de la HSL en familias de obesos y polimorfismos de los genes para HSL y para los receptores adrenérgicos β_2 y β_3 en asociación a la obesidad humana. Los adipocitos de pacientes obesos se caracterizan por presentar niveles altos de receptores adrenérgicos α_2 y un ratio elevado de receptores adrenérgicos α_2/β (39). Además, en modelos animales se ha demostrado una correlación positiva entre el grado de obesidad y el ratio de receptores adrenérgicos α_2/β (40).

2.3. El WAT como órgano endocrino

El tejido adiposo blanco no sólo es un órgano de reservorio de energía sino también un órgano secretor de ciertas moléculas que tienen una acción endocrina, paracrina y autocrina (41). Algunas de estas moléculas secretadas por los adipocitos están implicadas en la regulación del peso corporal (leptina, adiponectina), en la respuesta inflamatoria generada localmente en una situación de obesidad (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), en la función vascular (Ang II y PAI-1) o reproductora (estrógenos, entre otras).

La leptina es una hormona secretada principalmente por los adipocitos teniendo un papel relevante en la regulación del peso corporal a través de sus efectos centrales, sobre el apetito y periféricos, sobre el gasto energético (42). La concentración de leptina circulante disminuye en condiciones de ayuno o restricción calórica y aumenta en respuesta a la ingesta, principalmente en respuesta a glucosa (43, 44). Sin embargo, la gran mayoría de pacientes obesos presentan concentraciones elevadas de leptina y están aumentados en relación al grado de adiposidad y de hiperinsulinemia, lo que ha llevado al concepto de leptinorresistencia (45). Esta hiperleptinemia ha sido involucrada en la insulinoresistencia del obeso a través de alteraciones en la fosforilación del receptor de la insulina (46). Otra de las hormonas secretadas por los adipocitos que participa en el control de la ingesta es la adiponectina (Acyp30/AdipoQ). Es una adipocitoquina implicada en la regulación del metabolismo energético del organismo, ya que estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa mediante un aumento de la sensibilidad a la insulina (47). En diversos estudios, se ha observado hipoadiponectinemia en pacientes con obesidad, diabetes mellitus y arteriopatía coronaria (48, 49). Además de sus propiedades antidiabéticas, la adiponectina posee un efecto antiaterogénico y también tiene una relación inversa con otros factores de riesgo como la presión arterial, el colesterol total y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (50-53). Los estudios transversales de población muestran que concentraciones bajas de adiponectina están relacionadas con un aumento del perfil de riesgo metabólico y cardiovascular (54, 55). Recientemente, se ha identificado una nueva molécula, la resistina, secretada por los adipocitos maduros y que podría ser el nexo de unión entre la obesidad y el desarrollo de resistencia a la insulina (56). En roedores parece estar clara su implicación en la resistencia a la insulina. Sus niveles circulantes se incrementan durante la obesidad, su bloqueo mejora la homeostasis de la glucosa y su administración ejerce un efecto negativo sobre los tejidos diana de la insulina. En humanos, sin embargo, el papel de la resistina no está ni mucho menos esclarecido, y los trabajos publicados son bastante contradictorios. Parece que esta hormona podría ejercer algún papel en la respuesta inflamatoria debido a su mayoritaria expresión en células mononucleares (57). Se requieren, por tanto, nuevos estudios para determinar el papel de esta molécula tanto en la obesidad como en la resistencia a la insulina.

Diversas citoquinas proinflamatorias son secretadas por distintos tipos celulares incluidos los adipocitos. Tienen una acción paracrina o autocrina en el propio tejido y participan en la respuesta inflamatoria local que se produce en los adipocitos de pacientes obesos. Se ha descrito que los niveles de TNF- α en el adipocito están correlacionados positivamente con el tamaño de los depósitos adiposos. Además, la expresión del RNA mensajero del TNF- α está aumentada en el tejido adiposo de distintos modelos murinos de obesidad y diabetes y de pacientes

obesos, relacionándose dicho aumento con el desarrollo de resistencia a la insulina (58, 59). Por un lado, el TNF- α activa la lipólisis e inhibe los niveles de LPL y GLUT-4 como un mecanismo que trata de reducir el tamaño excesivo de los depósitos grasos. Sin embargo, los niveles altos de TNF- α en el tejido adiposo podría deberse a alguna de las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad como es la resistencia a la insulina. Así, el TNF- α aumenta los niveles de ácidos grasos libres, reduciendo la sensibilidad a insulina, y tiene un efecto inhibitorio directo en la acción de la insulina en el hígado, incrementando la producción de glucosa hepática (60, 61). Sin embargo, las acciones biológicas del TNF- α podría estar influenciadas por la expresión de dos receptores: p60 TNFR (TNF-R1) y p80 TNFR (TNF-R2). La expresión de TNF-R1 está positivamente correlacionada con el índice de masa corporal y el tamaño de los adipocitos, mientras que la expresión de TNF-R2 muestra asociaciones positivas con la concentración circulante de insulina y triglicéridos (62). Así, interfiriendo la vía de señalización del TNF- α se protege la resistencia a la insulina inducida por obesidad (63). La neutralización del TNF- α usando un anticuerpo monoclonal reduce los niveles de glucosa del modelo murino diabético KKAy (64) y mejora el control glicémico en pacientes con diabetes tipo 2 (65). Del mismo modo, el tratamiento con un anticuerpo anti-TNF- α durante seis semanas redujo la hiperglucemia en el ayuno, la intolerancia a la glucosa y mejoró la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo blanco visceral, principalmente en el compartimento gonadal, del ratón BATIRKO de 52 semanas, que presenta un aumento de la adiposidad asociado a una lipoatrofia marrón severa. En este modelo, el tratamiento con anti-TNF- α redujo la activación de NF- κ B en ambos tejidos adiposos, y la expresión de moléculas controladas por dicho factor de transcripción tanto en el tejido adiposo blanco gonadal, en el tejido adiposo marrón así como en la aorta. Además, las alteraciones vasculares, como la resistencia a la insulina vascular, y disfunción vascular fueron revertidas por el tratamiento con anti-TNF- α (66).

El angiotensinógeno y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) son moléculas secretadas también por los adipocitos y cuya expresión génica está aumentada en situaciones de obesidad (67, 68), teniendo un efecto deletéreo sobre la función vascular. Además, otro componente del sistema renina-angiotensina que también tiene el adipocito es la angiotensina II, que posee un efecto estimulante sobre la diferenciación del tejido adiposo y tiene su implicación en la regulación de la adiposidad debido a sus acciones lipogénicas (69). En relación a la secreción de PAI-1 por el tejido adiposo, se ha observado una mayor producción en la grasa visceral que en la grasa subcutánea. En este sentido, los niveles de PAI-1 estaban aumentados en la obesidad central relacionándose con las alteraciones vasculares asociados a la misma (68).

2.4. Papel del WAT en la inflamación generada en la obesidad y en las alteraciones vasculares asociadas

En una situación de obesidad asociada a una resistencia a la insulina, tanto el exceso de dieta como la propia obesidad producen una acumulación de lípidos en los adipocitos, iniciándose un estrés en la célula y la activación de la vía de las JNK y del factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B) (70, 71). Estas vías de señalización inflamatorias regulan la fosforilación de proteínas y distintos eventos celulares transcripcionales que conducen a un aumento por parte del adipocito en la producción de moléculas proinflamatorias, incluidas el TNF- α , IL-6, leptina y resistina, de quimioquinas tales como la proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1), y de otros mediadores proaterogénicos, como por ejemplo PAI-1. Moléculas de adhesión endotelial (ej.: ICAM-1 y VCAM-1), y moléculas quimioattractantes (ej.: CXCL) se unen a integrinas y receptores de quimioquinas (CCR), respectivamente, y favorecen el reclutamiento de monocitos y otras células inflamatorias al tejido adiposo. Los monocitos una vez en el interior se diferencian a macrófagos y amplifican la respuesta inflamatoria produciendo muchas de las mismas citoquinas y quimioquinas inflamatorias mencionadas previamente (72) (Figura 1). Un número reciente de artículos han sugerido también que los linfocitos T podrían desempeñar un papel importante en la producción de citoquinas proinflamatorias y en el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo en obesos. Al igual que los monocitos, las células T que circulan a través del organismo, infiltran los tejidos periféricos en respuesta a las señales de quimioquinas y citoquinas. El infiltrado de linfocitos precede a la población de monocitos en respuesta a dieta grasa y podría proporcionar mediadores proinflamatorios que promueven el reclutamiento y la activación de macrófagos (Figura 1). Los linfocitos T citotóxicos del linaje CD8 están muy enriquecidos en el tejido adiposo de ratones sometidos a dieta grasa, resultando consistente con el aumento significativo de células CD8 en pacientes obesos (73). Así, ratones deficientes en CD8 fueron parcialmente resistentes a desarrollar obesidad inducida por dieta rica en grasas, mientras que la transferencia de células CD8 agravaba la inflamación del tejido adiposo (73).

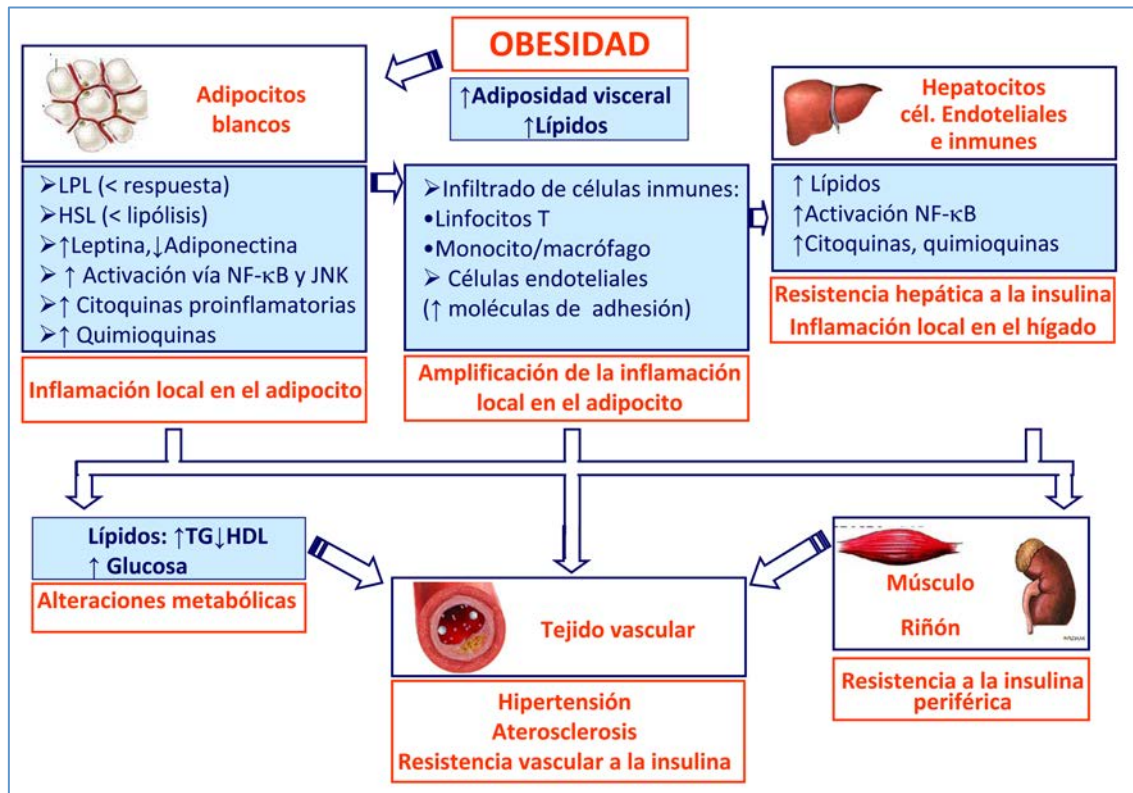


Figura 1.- Contribución del tejido adiposo blanco en la obesidad y las complicaciones metabólicas y vasculares asociadas. En una situación de obesidad se produce una acumulación de lípidos en los adipocitos, iniciándose un estrés en la célula y la activación de la vía de las JNK y del NF-κB, generándose una inflamación local en el adipocito blanco. Ésta puede exportarse a través de la vía portal al hígado y finalmente, a otros tejidos periféricos, como el territorio vascular donde podría producir aterosclerosis, hipertensión y resistencia vascular a la insulina.

Además de los propios adipocitos y las células inflamatorias, otros tipos celulares podría participar en dicha respuesta inflamatoria. Así, el tejido adiposo está vascularizado, con múltiples capilares en contacto con cada adipocito (74). En este sentido, para la expansión de la grasa, la microcirculación podría desempeñar un papel clave en la inflamación del tejido adiposo. Así, en un endotelio normal que es antiadherente, los leucocitos no se adhieren, mientras que después de la administración de dieta rica en grasas se ha demostrado que dicho endotelio expresa moléculas de adhesión y une leucocitos (75). Las células endoteliales del tejido adiposo podrían aumentar la expresión de proteínas de adhesión, como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina o P-selectina en respuesta a un aumento de la adiposidad y favorecer así la adhesión de células inflamatorias como linfocitos T y monocitos (76).

El aumento de la adiposidad no sólo activa la respuesta inflamatoria en el adipocito sino también a través de la vía portal en el hígado (77) (Figura 1). Esto sugiere que la acumulación lipídica en los hepatocitos o esteatosis podría inducir una respuesta inflamatoria subaguda en el hígado, que es similar a la inflamación en el tejido adiposo que sigue a la acumulación lipídica en el adipocito. Las moléculas proinflamatorias producidas en la grasa abdominal a través de la

circulación portal podrían ser las responsables del inicio de la inflamación hepática. Además en el propio hepatocito graso se produce la activación de NF- κ B y un aumento de la expresión de citoquinas, incluidas el TNF- α , IL-6 e IL-1 β (77). Las citoquinas proinflamatorias participan en el desarrollo de la resistencia a la insulina y activan a los macrófagos hepáticos residentes llamadas células Kupffer. El hígado está densamente poblado por células Kupffer que representan aproximadamente el 5% del total de las células. En la obesidad con el aumento de la adiposidad no aumenta el número de células Kupffer sino su activación (77). En el hígado, al igual que en el tejido adiposo hay distintos tipos de células que participan en el inflamación y en la resistencia a la insulina a nivel local del hepatocito como son las células inmunes y las células endoteliales (78). Por tanto, los mediadores proinflamatorios y proaterogénicos que son producidos por el tejido adiposo y el hígado y asociados a las células inmunes generan una inflamación sistémica que produce resistencia a la insulina en el músculo esquelético y otros tejidos periféricos. En el tejido vascular, además de producir resistencia a la insulina vascular, podrían contribuir a iniciar el proceso aterogénico (79) (Figura 1).

3. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN EN LA OBESIDAD Y SUS COMPLICACIONES METABÓLICAS Y VASCULARES ASOCIADAS

3.1. Morfología y distribución del BAT

El tejido adiposo marrón está formado por adipocitos marrones y células progenitoras de adipocitos. Así, el adipocito marrón tiene una forma poligonal con un núcleo oval y centrado en un citoplasma grande que contiene múltiples y pequeñas gotas lipídicas. Posee un gran número de mitocondrias y un retículo endoplasmático poco desarrollado. Además, se encuentra altamente vascularizado e innervado (80). Originalmente, se pensó que el BAT estaba presente en los seres humanos sólo durante el período neonatal. Sin embargo, datos recientes han demostrado que los adultos conservan algunos depósitos metabólicamente activos de BAT que responden al frío y a la activación simpática del sistema nervioso. Dichos depósitos son UCP-1 positivos y son detectados por tomografía por emisión de positrones (PET). Actualmente, en humanos, el tejido adiposo marrón se ha descrito que está localizado en depósitos de la región cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal, para-aórtica y suprarrenal (81). Además, también se han localizado pequeños grupos de adipocitos marrones en el interior del músculo esquelético en adultos humanos (13). Por otro lado, recientes datos han mostrado que los adipocitos marrones encontrados en el interior de otros depósitos de tejido adiposo blanco no son derivados del linaje myf5, como son los clásicos adipocitos marrones del tejido interescapular de los roedores, y se denominan células beige (82). Dichas células son positivas para UCP-1, con alta capacidad respiratoria, con

características de tejido adiposo blanco y marrón y con una alta sensibilidad a la hormona polipeptídica irisina (83). En este sentido, se habría mostrado previamente que la irisina secretada por el músculo esquelético y que se incrementa con el ejercicio, induce la “marronización” del tejido adiposo blanco subcutáneo. Sin embargo, esta proteína tiene poco efecto en los clásicos adipocitos marrones aislados del depósito interescapular (84). Todo ello, sugiere que la respuesta a la irisina podría ser una característica selectiva de las células beige localizadas en el interior de los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo.

El tejido adiposo marrón además de estar implicado en la termogénesis, recientes estudios han demostrado que pudiera estar implicado en la liberación de triglicéridos y en la utilización de glucosa, además de servir como fuente de adipoquinas y poseer distinta función inflamatoria comparada con el tejido adiposo blanco.

3.2. La relación de BAT con la obesidad y sus complicaciones vasculares y metabólicas

La activación del tejido adiposo marrón reduce la adiposidad y protege al ratón de la obesidad inducida por la dieta rica en grasas (85, 86). Así, la pérdida de la masa del tejido adiposo marrón (87), como puede ser una lipoatrofia marrón severa por una delección del receptor de la insulina en ese tejido (66, 88), o la pérdida de UCP-1 (89) confiere susceptibilidad a desarrollar obesidad en ratones. En los últimos años, se ha descrito que la cantidad de BAT estaba inversamente correlacionada con el índice de masa corporal en humanos, especialmente en personas de avanzada edad (90). Además, se ha demostrado recientemente que el tejido adiposo marrón podría proteger frente a múltiples enfermedades relacionadas con el envejecimiento (14). Así, individuos con depósitos de BAT más pequeños son más susceptibles a acumular tejido adiposo blanco y aumentar su peso corporal y tener un mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas y vasculares asociadas a dicha obesidad (85, 91).

3.3. El BAT y la termogénesis

Una de las principales funciones del tejido adiposo marrón es la activación de la termogénesis a través de la activación de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), generando calor a partir de los ácidos grasos (92). En la termogénesis, el tejido adiposo marrón utiliza, en primer lugar, los lípidos almacenados como sustrato para generar calor. Esta fase temprana de la termogénesis corresponde con la liberación de norepinefrina del sistema nervioso simpático activando la liberación de ácidos grasos de las gotas de triglicéridos. Algunos de estos ácidos grasos activan a UCP-1. Los ácidos grasos remanentes son importados a la mitocondria y allí se realiza la termogénesis con la disipación de energía en forma de calor debido a la acción de UCP-1. Como el tejido adiposo marrón es un pequeño porcentaje del

total del peso corporal, para mantener una termogénesis sostenida es necesario importar y quemar triglicéridos circulantes (93).

3.4. El BAT y el metabolismo lipídico y glucídico

El tejido adiposo marrón además de estar implicado en la termogénesis, recientes trabajos han demostrado que podría tener un papel destacado en el metabolismo lipídico y glucídico (Figura 2). En primer lugar, el tejido adiposo marrón podría estar implicado en la eliminación de triglicéridos. Así, las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRLs) transportan lípidos en la circulación, donde una porción de los ácidos grasos puede ser liberada por la LPL (94). Otros órganos periféricos, como el tejido adiposo blanco y el músculo esquelético captan ácidos grasos, mientras que las partículas remanentes ricas en colesterol son eliminadas por el hígado (94). Además, niveles elevados de triglicéridos y de partículas remanentes ricas en colesterol, como ocurre en la dislipidemia diabética, representan factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares (95-97). Se ha descrito que el aumento de la actividad del tejido adiposo marrón por exposiciones cortas al frío podría controlar el metabolismo de las TRLs en ratón, regulando la eliminación de dichas lipoproteínas y el exceso de lípidos circulantes (93) y así disminuyendo los niveles de triglicéridos y aumentando ligeramente los niveles de HDL (Figura 2). Así, los ácidos grasos son eficientemente introducidos en el propio tejido adiposo marrón debido a un programa metabólico que empuja a las TRLs a una captación muy eficiente de los ácidos grasos. Este proceso asociado con un aumento de la expresión de VEGF (98), conduce a un incremento de la permeabilidad para las lipoproteínas, permitiendo que los triglicéridos salgan de los capilares. La activación del tejido adiposo marrón por norepinefrina no sólo activa la liberación de los ácidos grasos de los triglicéridos dentro del propio tejido adiposo marrón junto con una mayor producción de VEGF, también aumenta la expresión de la LPL (93, 99). Por tanto, LPL degrada los triglicéridos y permite que los ácidos grasos puedan estar disponibles a través de transportadores de membrana plasmática como el CD36. Además, se ha demostrado en humanos que la activación de BAT por exposición al frío, incrementa su metabolismo oxidativo, reduciendo el contenido de triglicéridos y contribuyendo de forma decisiva al gasto energético (100). Por tanto, la activación de BAT sería capaz de corregir las hiperlipidemias y mejorar los efectos deletéreos de la obesidad y la dislipidemia como pueden ser la resistencia a la insulina o el proceso aterogénico. Recientemente, se ha descrito que el tejido adiposo epicárdico (EAT) podría ser un depósito de tejido adiposo marrón activo que es capaz de modificar los niveles de lípidos circulantes alterados, así aumentando los niveles de HDL y disminuyendo los niveles de triglicéridos (101).

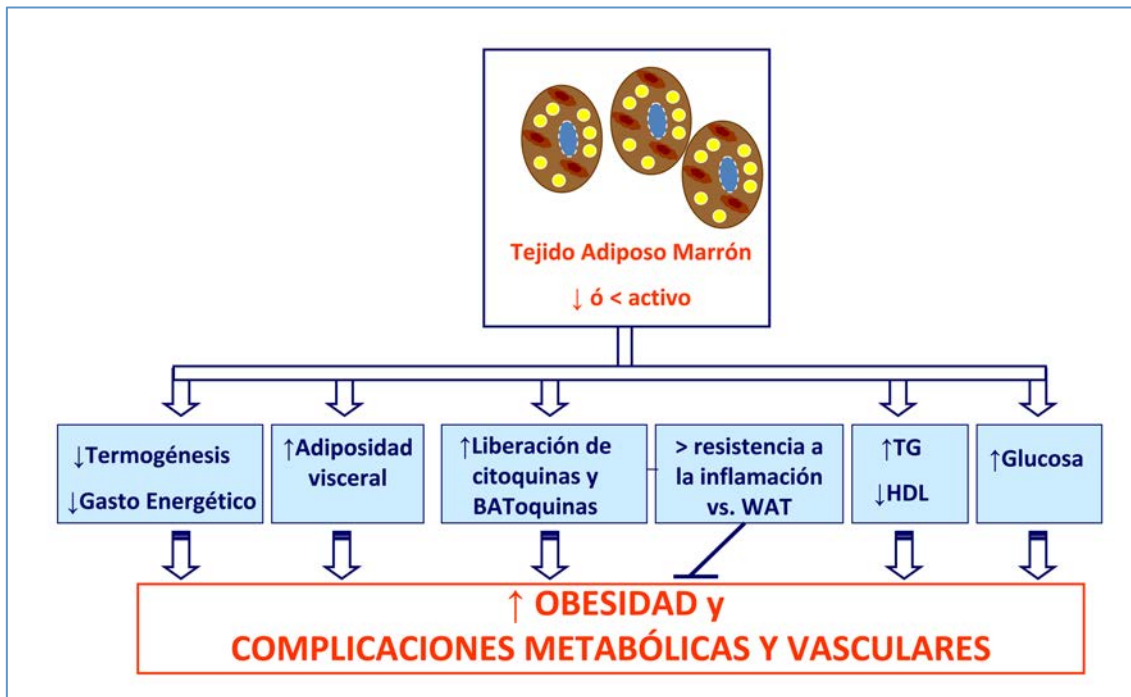


Figura 2.- Contribución del tejido adiposo marrón en la obesidad y las complicaciones metabólicas y vasculares asociadas. Una de las posibles causas que inducen el desarrollo de la obesidad podría ser una disminución de la cantidad y actividad del tejido adiposo marrón. En esta situación se produciría una alteración de funciones que realiza el tejido adiposo marrón en el metabolismo lipídico, glucídico así como el perfil de expresión de citoquinas y adipoquinas, favoreciéndose la obesidad y las complicaciones metabólicas y vasculares asociadas a la misma.

Por otro lado, también se ha descrito que el tejido adiposo marrón, podría también estar regulando el metabolismo glucídico (93). Dicho tejido tiene una alta captación de glucosa debido probablemente a una intensa combustión de glucosa en la mitocondria, más que por acción de la insulina. La mitocondria del tejido marrón utiliza el piruvato para la combustión siempre que UCP-1 esté activo por los ácidos grasos (102). Asimismo, los transportadores de glucosa, GLUT-1 y GLUT-4, podrían estar implicados en la captación de glucosa por parte del BAT ya que la actividad y expresión de ambos transportadores está aumentada tanto por frío como por norepinefrina (93, 103, 104).

3.5. El BAT como órgano endocrino

El tejido adiposo marrón es un órgano endocrino al igual que el tejido adiposo blanco. Secreta distintas citoquinas, hormonas y otros factores, como TNF- α , adiponectina y leptina al igual que el tejido adiposo blanco. Sin embargo, hay un gran número de moléculas que son exclusivamente secretadas por el tejido adiposo marrón, las llamadas BAToquinas (adipoquinas derivadas de BAT). Muchas de estas BAToquinas, incluida el factor de crecimiento fibroblástico (FGF21), son requeridas en la adaptación al frío y en la estimulación adrenérgica (105-107). Además, FGF21 puede actuar también de forma directa sobre el tejido adiposo marrón, independientemente del control adrenérgico, lo que permitirá abrir nuevas vías para explorar mecanismos de control de la grasa corporal (107).

Otras proteínas secretadas también por el BAT, como adiposina, FGF2, IGF-1, prostaglandinas y la adenosina, desempeñan también funciones autocrinas.

Además, el tejido adiposo marrón secreta otros factores como IL-6 y factores neurotróficos, como el BDNF y el factor de crecimiento nervioso (NGF), los cuales podrían tener papeles únicos en el BAT con respecto al WAT (108-111). La secreción de NGF se produce principalmente por la proliferación de preadipocitos marrones, que promueve la inervación simpática del tejido, y a su vez permite una mayor estimulación por norepinefrina en los adipocitos marrones. Otros factores paracrinos, además de los neurotróficos, sintetizados por el BAT son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el angiotensinógeno y el óxido nítrico. La expresión de VEGF con sus receptores, FLK-1 y FLK-4, es alta en la proliferación y madurez de adipocitos marrones, manteniendo alto el nivel de vascularización de este tejido. Tanto la noradrenalina como la exposición al frío inducen un aumento de la expresión de VEGF en BAT (112). Por otro lado, tanto la óxido nítrico inducible (iNOS) como la endotelial (eNOS) se expresan en el BAT y la noradrenalina induce un aumento en la producción de óxido nítrico (NO) que inhibe la oxidación mitocondrial y promueve un rápido aumento en el flujo sanguíneo (113).

A diferencia del tejido adiposo blanco que rápidamente es infiltrado por células inflamatorias en respuesta a la obesidad inducida por dieta grasa, el tejido adiposo marrón no parece acumular tanto infiltrado de macrófagos (114) (Figura 2). Esto puede deberse, a que el BAT tiene un mayor número de mitocondrias que le permite metabolizar los ácidos grasos a través de la β -oxidación. Sin embargo, en el WAT, la capacidad para metabolizar los lípidos estaría superada, teniendo efectos lipotóxicos y desencadenando la respuesta inflamatoria y facilitando el infiltrado de macrófagos y células inmunes. En este sentido, otro grupo reciente ha demostrado que los macrófagos del tejido adiposo marrón no tienen el mismo perfil de expresión de citoquinas y quimioquinas que los macrófagos del tejido adiposo blanco (115).

4. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO PERIVASCULAR EN LA OBESIDAD Y SUS COMPLICACIONES METABÓLICAS Y VASCULARES ASOCIADAS

4.1. Morfología y distribución del PVAT

El tejido adiposo perivascular (PVAT) se encuentra rodeando la arteria coronaria (o tejido adiposo epicárdico), la aorta (tejido adiposo periaórtico) y otros vasos sistémicos así como el lecho microcirculatorio de las mesentéricas, músculo, riñón y tejido adiposo a excepción de la circulación cerebral (116). Se une al exterior de la capa adventicia sin ninguna estructura laminar o barrera organizada que separe a las dos. Dependiendo del lecho vascular, PVAT puede

tener más o menos características de tejido adiposo blanco o marrón. Así, se ha descrito que el PVAT de la arteria abdominal sería prácticamente tejido adiposo blanco, el PVAT de las arterias coronarias humanas tendría un fenotipo intermedio entre adiposo blanco y marrón y el PVAT de la arteria aórtica torácica sería muy similar al tejido adiposo marrón (92, 117). La vascularización y la innervación del PVAT también varían de forma considerable con la localización y podría ayudar a explicar las distintas características funcionales de PVAT.

4.2. Papel de PVAT en la obesidad y en las complicaciones vasculares asociadas

PVAT está constituido por los adipocitos, fibroblastos, células madre, células que penetran el vaso vasorum y células inflamatorias infiltradas como macrófagos y linfocitos T, pudiendo ser estas últimas relevantes en determinadas situaciones patológicas (116).

El tejido adiposo perivascular que se extiende desde la capa adventicia es un modulador clave de la función vascular tanto en sujetos delgados como en animales delgados de experimentación. Sin embargo, en una situación de obesidad, el tejido perivascular aumenta su tamaño, creando un entorno de hipoxia que podría disminuir la producción de adiponectina que tiene efectos protectores frente a la aterogénesis y otras complicaciones vasculares (117) (Figura 3). Además, en la obesidad así como en el síndrome metabólico PVAT pierde su capacidad vasorreguladora porque hay una menor liberación de adipoquinas vasodilatorias y simultáneamente se liberan más factores que promueven la vasoconstricción (118). Así, el tejido adiposo perivascular tiene propiedades anticontráctiles y algunos estudios encuentran que éstas se pierden en la obesidad (116) (Figura 3). También se ha descrito, que el aumento de PVAT podría estar correlacionado positivamente con la cantidad de tejido adiposo intra-abdominal (119). Por tanto, en una situación de obesidad y aterosclerosis, el PVAT además de expandirse puede ser infiltrado por células inmunes, como macrófagos y linfocitos T (114, 121). La acumulación de linfocitos T favorecería la expansión del tejido adiposo debido a la estimulación de la adipogénesis por producción de 15d-PGJ2 y activación de PPAR- γ (121). Sin embargo, los macrófagos no afectan a la expansión del PVAT, pero producen citoquinas que alteran la secreción de adipoquinas de dicho tejido. Así, la producción de leptina (123, 124), de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (125, 126) además de especies libres de oxígeno (116, 127) y ácidos grasos no esterificados (128) está aumentada en el PVAT de pacientes obesos y de animales de experimentación obesos (Figura 3).

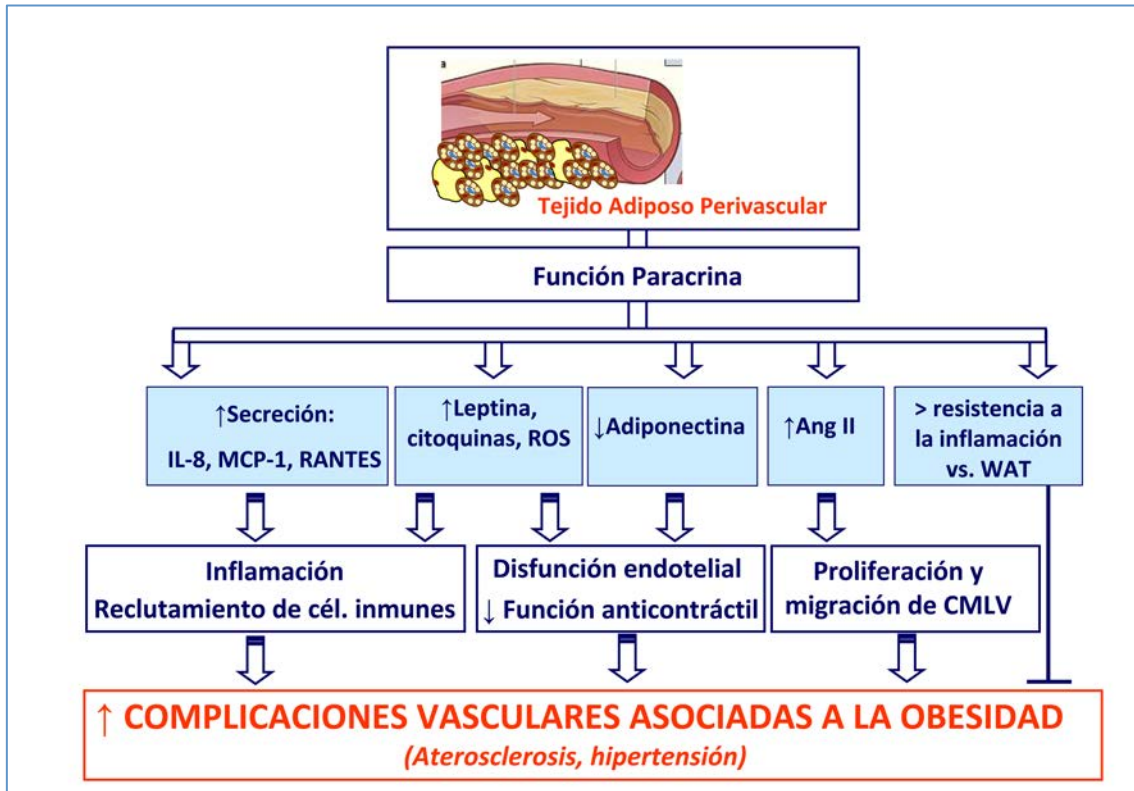


Figura 3.- Contribución del tejido adiposo perivascular en las complicaciones vasculares asociadas a la obesidad. El tejido adiposo perivascular interacciona con el endotelio, las células de músculo liso vascular y las células inmunes. Igualmente, se producen ciertos mediadores que estarían implicados en las posibles alteraciones vasculares asociadas a la obesidad, tales como la hipertensión y la aterogénesis.

Sin embargo, se ha descrito que las propiedades inflamatorias del tejido adiposo epicárdico son independientes de la obesidad (129). En este sentido, estudios recientes también han demostrado que el PVAT que está alrededor de la arteria aorta torácica es muy similar a BAT en cuanto a su morfología y el perfil de expresión genética en ratones (114). Además, el tejido adiposo perivascular de la aorta torácica junto con el BAT son más resistentes a la inflamación inducida por una dieta rica en grasas en un modelo murino (114) (Figura 3). Sería interesante, comprobar si el tejido adiposo perivascular en pacientes obesos con y sin enfermedad cardiovascular tiene una morfología y un perfil genético parecido también al BAT como ocurre en los modelos murinos estudiados. Así, podría resultar beneficiosa la activación del fenotipo tejido adiposo marrón en el tejido adiposo perivascular con el fin de prevenir enfermedades vasculares asociadas a la obesidad, como hipertensión y la aterogénesis.

5. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD

Las primeras indicaciones para el tratamiento de la obesidad junto con la restricción calórica es el ejercicio físico de manera dosificada y con cargas adecuadas a la condición física de cada paciente obeso. Existen considerables evidencias que la restricción calórica aumenta la esperanza de vida (130) y reduce el riesgo de desarrollar diabetes, enfermedad cardiovascular, desórdenes degenerativos y algunos tipos de cáncer (130, 131). Los dos mecanismos principales que estarían implicados en los efectos “anti-envejecimiento” y “anti-obesidad” de la restricción calórica, serían: (1) una menor producción de radicales libres mitocondriales (132), y (2) un aumento de la producción de proteínas resistentes al estrés celular (133). Además de la restricción calórica, hay evidencias que muestran que un balance energético mantenido durante varios meses, donde se incluye un aumento del gasto energético suele resultar efectivo en la disminución de la adiposidad. Esta reducción se produce principalmente en la grasa visceral, que es la que posee receptores y actividad lipolítica mayor que el tejido adiposo de otras regiones (134). Además, personas con un buen estado físico tienen la lipólisis en reposo mayor que los inactivos (135). Otro aspecto que mejora el ejercicio físico en pacientes obesos es el perfil lipídico. En primer lugar, eleva las HDL y por tanto disminuye el cociente LDL/HDL y el riesgo cardiovascular (136). Además, el ejercicio aumenta el tamaño de las partículas de LDL y HDL resultando un perfil lipídico menos aterogénico que las partículas pequeñas de LDL y HDL, propias de los pacientes obesos (136). Asimismo, un ejercicio físico regular también disminuye los niveles de triglicéridos en aquellos individuos con valores inicialmente altos, a través de una mejora en la sensibilidad a la insulina (137, 138). También el ejercicio físico produce distintas adaptaciones metabólicas que pueden resultar beneficiosas para el tratamiento de la obesidad. Se produce un aumento del potencial oxidativo y así, se favorece que se metabolicen más lípidos e hidratos de carbono de forma aeróbica, produciendo adaptaciones periféricas muy deseables. Por tanto, el ejercicio físico normaliza el perfil metabólico y permite la disminución de la morbimortalidad por estas causas (139, 140).

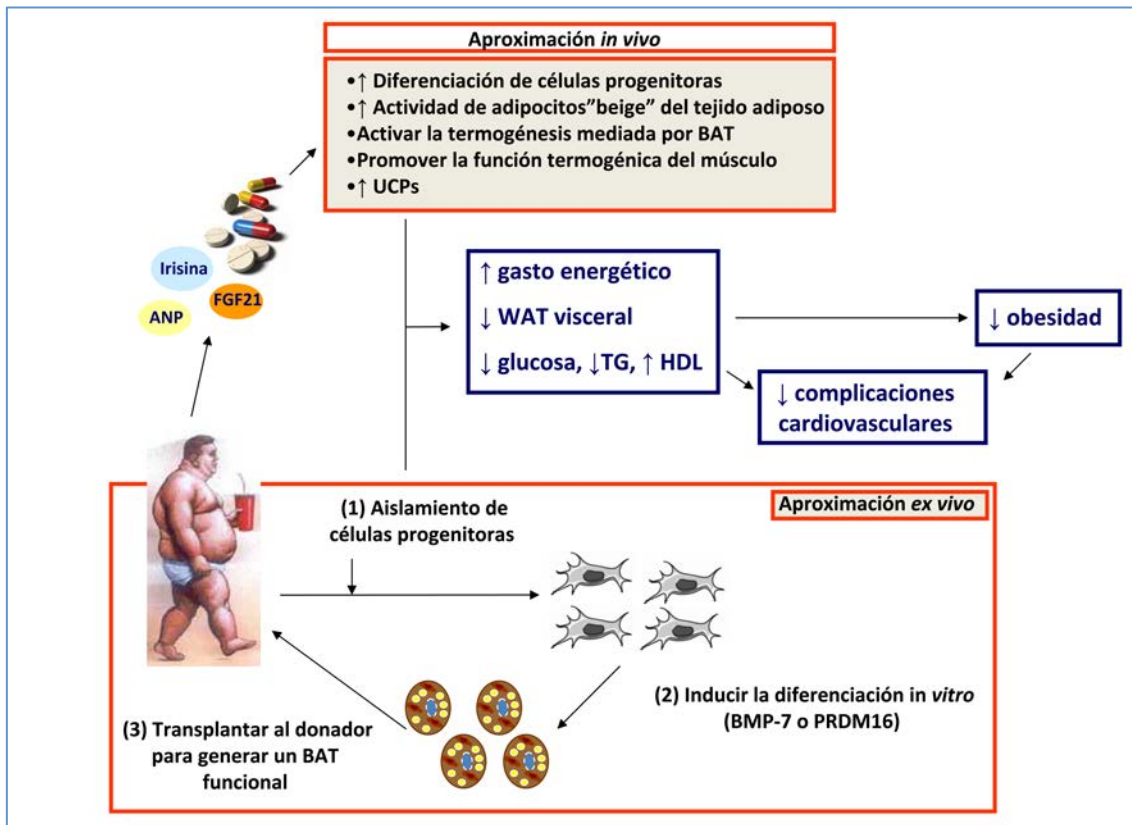


Figura 4.- Nuevas perspectivas en el tratamiento de la obesidad. Basado en los conocimientos actuales como futuras aproximaciones tanto *in vivo* como *ex vivo* para el tratamiento de la obesidad. Todas ellas están destinadas a producir la activación del tejido adiposo marrón o la diferenciación de células progenitoras o beiges en adipocitos marrones o promover la termogénesis en el músculo con el fin de favorecer la termogénesis, el gasto energético, la reducción de la adiposidad visceral así como un mejor control de la glucosa y el perfil lipídico, todo ello reduciendo la obesidad y las complicaciones vasculares asociadas.

Para poder combatir esta epidemia mundial que es la obesidad y evitar así las complicaciones metabólicas y vasculares que está continuamente creciendo, además de los tratamientos establecidos, tanto la restricción calórica, el ejercicio, los distintos fármacos o la cirugía, hay que aunar esfuerzos para avanzar en el conocimiento del tejido adiposo marrón y su prometedor potencial terapéutico frente a la obesidad y las complicaciones asociadas (141-143). Se ha descrito que la respuesta adaptativa del tejido adiposo marrón a un moderado e intermitente estrés a través de la activación simpática, podría aumentar la proliferación y diferenciación de células progenitoras de adipocitos marrones, además de incrementar la masa mitocondrial y la expresión de UCP-1 en tejido adiposo marrón (144). Todos estos efectos, junto con la estimulación de BAT en los depósitos de tejido adiposo blanco o en el músculo esquelético (145, 146), podrían aumentar el gasto energético y reducir el estrés oxidativo y la adiposidad visceral y en consecuencia, una mayor resistencia a desarrollar obesidad y enfermedades metabólicas y vasculares asociadas a la misma. Curiosamente, el trasplante de tejido adiposo marrón (0.1-0.4 g) a la cavidad visceral de un ratón es capaz de prevenir la ganancia de peso y mejorar la homeostasis glucídica en el ratón obeso

sometido a dieta grasa (147). Por otro lado, como se han identificado que los depósitos de tejido adiposo marrón en humanos están compuestos por adipocitos beige (83); estos resultados podrían abrir nuevas vías de investigación para determinar si este tipo de células podrían tener cierto potencial terapéutico. Así, la irisina que es una molécula circulante endógena y media algunos beneficios que produce el ejercicio y además activa a los adipocitos beige en roedores, podría representar uno de los caminos aplicables a humanos. Finalmente, dada la capacidad del tejido adiposo marrón en el gasto energético y los efectos sobre el metabolismo lipídico y glucídico, así como su potencial resistencia a la inflamación junto con el tejido adiposo perivascular; las nuevas perspectivas del tratamiento de la obesidad podrían centrarse en el diseño de nuevos fármacos o distintos regímenes o terapias que incrementen la cantidad y función del tejido adiposo marrón no sólo para luchar contra la obesidad sino también para prevenir la diabetes tipo 2 y otros desórdenes metabólicos y vasculares (Figura 4).

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev.* 2007;29:1-5.
2. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva N°311. Organización Mundial de la Salud. Marzo de 2011
3. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 2007; 131(2):242-56.
4. Cascio G, Schiera G, Di Liegro I. Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases. *Curr Diabetes Rev.* 2012; 8(1):2-17.
5. Mathieu P, Lemieux I, Després JP. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin Pharmacol Ther.* 2010; 87(4):407-16.
6. Grundy SM. Metabolic complications of obesity. *Endocrine.* 2000;13(2):155-65.
7. Aldhahi W, Hamdy O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2003; 3(4):293-8.
8. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64(4):355-65.
9. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006; 4(4):263-73.
10. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006; 444 (7121):847-53.
11. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature.* 1993; 366(6457):740-2.
12. Yang X, Enerbäck S, Smith U. Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res.* 2003; 11 (10):1182-91.
13. Almind K, Manieri M, Sivitz WI, Cinti S, Kahn CR. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(7):2366-71.
14. Mattson MP. Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Res Rev.* 2010; 9(1):69-76.
15. Johnson PR, Zucker LM, Cruce JA, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res.* 1971; 12(6):706-14.
16. Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest.* 1983; 72(3):1150-62.
17. Coon PJ, Rogus EM, Drinkwater D, Muller DC, Goldberg AP. Role of body fat distribution in the decline in insulin sensitivity and glucose tolerance with age. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75(4):1125-32.

18. Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Matsuda M, Mahankali S, Santini E, et al. Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(11):5098-103.
19. Marin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, et al. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism.* 1992; 41(11):1242-1248.
20. Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S. Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 1997; 46(3):342-347.
21. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21(6):697-738.
22. Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991; 14(12):1132-1143.
23. Hellmer J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75(1):15-20.
24. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004; 145(5):2273-2282.
25. Snijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CD, Kostense PJ et al. Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(5):1192-1197.
26. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 116(1):39-48.
27. Arner P, Eckel RH. Adipose tissue as storage organ. En: George A. Bray, Claude Bouchard, WPT. James, editors. *Handbook of Obesity.* 1998:379-395.
28. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 297(2):E271-88.
29. Bessesen DH, Robertson AD, Eckel RH. Weight reduction increases adipose but decreases cardiac LPL in reduced-obese Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1991; 261(2 Pt 1): E246-E251.
30. Eckel RH, Yost TJ. Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. *J Clin Invest.* 1987; 80(4):992-997.
31. Pollare T, Vessby B, Lithell H. Lipoprotein lipase activity in skeletal muscle is related to insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(5):1192-1203.
32. Sadur CN, Yost TJ, Eckel RH. Insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase is delayed but preserved in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59(6):1176-1182.
33. Hartman AD. Lipoprotein lipase activities in adipose tissues and muscle in the obese Zucker rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1981; 241(2):E108-E115.
34. Terretaz J, Cusin I, Etienne J, Jeanrenaud B. In vivo regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (fa/fa) rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994; 18(1): 9-15.
35. Schwartz RS, Brunzell JD. Increase of adipose tissue lipoprotein lipase activity with weight loss. *J Clin Invest* 1981; 67(5):1425-1430.
36. Llorente-Cebrián S, Kulyté A, Hedén P, Näslund E, Arner P, Rydén M. Relationship between site-specific HSL phosphorylation and adipocyte lipolysis in obese women. *Obes Facts.* 2011; 4(5):365-71.
37. Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Rydén M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, van Harmelen V, Gross RW, Holm C, Arner P. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes.* 2005; 54(11):3190-7.
38. Arner P. Hunting for human obesity genes? Look in the adipose tissue! *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24 Suppl 4:S57-62.
39. Valet P, Grujic D, Wade J, Ito M, Zingaretti MC, Soloveva V et al. Expression of human alpha 2-adrenergic receptors in adipose tissue of beta 3-adrenergic receptor-deficient mice promotes diet-induced obesity. *J Biol Chem.* 2000; 275(44):34797-802.

40. Boucher J, Castan-Laurell I, Le Lay S, Grujic D, Sibrac D, Krief S et al. Human alpha 2A-adrenergic receptor gene expressed in transgenic mouse adipose tissue under the control of its regulatory elements. *J Mol Endocrinol.* 2002; 29(2):251-64.
41. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280(6):E827-47.
42. Martí A, Berraondo B, Martínez JA. Leptin: physiological actions. *J Physiol Biochem.* 1999; 55(1):43-9.
43. Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH et al. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology.* 1998; 139(2):551-8.
44. Wellhoener P, Fruehwald-Schultes B, Kern W, Dantz D, Kerner W, Born J et al. Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(3):1267-71.
45. Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes.* 1999; 48(2):426-429.
46. McGill, JB, Schneider, DJ, Arfken, CL, Lucore, CL. Factors responsible for impaired fibrinolysis in obese subject and NIDDM patients. *Diabetes* 1994; 43(1): 104-109.
47. Palomer X, Pérez A, Blanco-Vaca F. Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease. *Med Clin (Barc)* 2005; 124(10):388-95.
48. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257(1):79-83.
49. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(6):1595-9.
50. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA.* 2004; 291(14):1730-7.
51. Kazumi T, Kawaguchi A, Sakai K, Hirano T, Yoshino G. Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure. *Diabetes Care.* 2002; 25(6):971-6.
52. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem.* 2002; 277(29):25863-6.
53. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 2001; 103(8):1057-63.
54. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J.* 2004; 68(11):975-81.
55. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N et al. Osaka CAD Study Group. Coronary artery disease. Association of hypo adiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(1):85-9.
56. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001 Jan 18;409(6818):307-12.
57. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300(2):472-6.
58. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95(5):2409-2415.
59. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444(7121):860-867
60. Duncan ER, Walker SJ, Ezzat VA, Wheatcroft SB, Li JM, Shah AM, et al. Accelerated endothelial dysfunction in mild prediabetic insulin resistance: the early role of reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293(5):E1311-E1319.
61. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesitydiabetes. Central role of tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 1994; 94(4):1543-1549

62. Hube F, Birgel M, Lee YM, Hauner H. Expression pattern of tumour necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1999; 29(8):672-678.
63. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14(5):447-455
64. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997; 389:610-614
65. Takano M, Nishihara R, Sugano N, Matsumoto K, Yamada Y, Takane M, et al. The effect of systemic anti-tumor necrosis factor- α treatment on *Porphyromonas gingivalis* infection in type 2 diabetic mice. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(5):379-384
66. Gómez-Hernández A, Otero YF, de las Heras N, Escribano O, Cachafeiro V, Lahera V, et al. Brown fat lipoatrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction. *Endocrinology.* 2012; 153(3):1242-55.
67. Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P. Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res.* 2000; 8(4):337-41.
68. Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T et al. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med.* 1996; 2(7):800-3.
69. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology.* 1997; 138(4):1512-9.
70. Gil A, María Aguilera C, Gil-Campos M, Cañete R. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br J Nutr.* 2007; 98 Suppl 1:S121-6.
71. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* 2011; 13(1):11-22.
72. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(11):738-49.
73. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 2009; 15(8):914-920.
74. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation.* 1997; 4(2):211-32.
75. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med.* 2002; 252(4):283-94.
76. Sengenès C, Miranville A, Lolmède K, Curat CA, Bouloumié A. The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue. *J Intern Med.* 2007; 262(4):415-21
77. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med.* 2005; 11(2):183-90.
78. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 2006; 43(2 Suppl 1):S54-62.
79. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006; 116(7):1793-801.
80. Mattson MP. Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Res Rev.* 2010; 9(1):69-76.
81. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006; 4 (4):263-73.
82. Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science.* 2010; 328(5982):1113-4.
83. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012; 150(2):366-76.
84. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012; 481(7382):463-8.
85. Ghorbani M, Claus TH, Himms-Hagen J. Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *Biochem Pharmacol.* 1997; 54(1):121-31.

86. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest.* 1998; 102(2):412-20.
87. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature.* 1993; 366:740-2.
88. Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Brüning J, Kozak LP, et al. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest.* 2001; 108(8):1205-13.
89. Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, et al. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell.* 2005; 4(3):147-55.
90. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009; 360(15):1509-17.
91. Hansen JB, Kristiansen K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J.* 2006; 398(2):153-68
92. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004; 84(1):277-359.
93. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med.* 2011; 17(2):200-5.
94. Williams KJ. Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J Clin Invest.* 2008; 118(10):3247-59.
95. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk.* 1996; 3(2):213-9.
96. Austin MA, McKnight B, Edwards KL, Bradley CM, McNeely MJ, Psaty BM, et al. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: A 20-year prospective study. *Circulation.* 2000; 101(24):2777-82.
97. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2009; 5(3):150-9.
98. Fredriksson JM, Nikami H, Nedergaard J. Cold-induced expression of the VEGF gene in brown adipose tissue is independent of thermogenic oxygen consumption. *FEBS Lett.* 2005; 579(25):5680-4.
99. Mitchell JR, Jacobsson A, Kirchgessner TG, Schotz MC, Cannon B, Nedergaard J. Regulation of expression of the lipoprotein lipase gene in brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 1992; 263(3 Pt 1):E500-6.
100. Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F, et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest.* 2012; 122(2):545-52.
101. Chechi K, Blanchard PG, Mathieu P, Deshaies Y, Richard D. Brown fat like gene expression in the epicardial fat depot correlates with circulating HDL-cholesterol and triglycerides in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2012 Jun 22.
102. Shabalina IG, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J. Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J Biol Chem.* 2004; 279(37):38236-48.
103. Nikami H, Shimizu Y, Endoh D, Yano H, Saito M. Cold exposure increases glucose utilization and glucose transporter expression in brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 185(3):1078-82
104. Dallner OS, Chernogubova E, Brolinson KA, Bengtsson T. Beta3-adrenergic receptors stimulate glucose uptake in brown adipocytes by two mechanisms independently of glucose transporter 4 translocation. *Endocrinology.* 2006; 147(12):5730-9.
105. Chartoumpakis DV, Habeos IG, Ziros PG, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, Papavassiliou AG. Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med.* 2011; 17(7-8):736-40.
106. Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T, et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem.* 2011; 286(15):12983-90.

107. Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab.* 2010; 11(3):206-12.
108. Nisoli E, Tonello C, Carruba MO. Nerve growth factor, beta3-adrenoceptor and uncoupling protein 1 expression in rat brown fat during postnatal development. *Neurosci Lett.* 1998; 246(1):5-8.
109. Nisoli E, Tonello C, Benarese M, Liberini P, Carruba MO. Expression of nerve growth factor in brown adipose tissue: implications for thermogenesis and obesity. *Endocrinology* 1996; 137(2):495-503.
110. Néchad M, Ruka E, Thibault J. Production of nerve growth factor by brown fat in culture: relation with the in vivo developmental stage of the tissue. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 1994; 107(2):381-8.
111. Sornelli F, Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L. Adipose tissue-derived nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: results from experimental stress and diabetes. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28 Spec No:179-83.
112. Tonello C, Giordano A, Cozzi V, Cinti S, Stock MJ, Carruba MO, et al. Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. *FEBS Lett.* 1999; 442(2-3):167-72.
113. Kikuchi-Utsumi K, Gao B, Ohinata H, Hashimoto M, Yamamoto N, Kuroshima A. Enhanced gene expression of endothelial nitric oxide synthase in brown adipose tissue during cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282(2):R623-6.
114. Fitzgibbons TP, Kogan S, Aouadi M, Hendricks GM, Straubhaar J, Czech MP. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(4):H1425-37.
115. Ortega MT, Xie L, Mora S, Chapes SK. Evaluation of macrophage plasticity in brown and white adipose tissue. *Cell Immunol* 2011; 271(1):124-33.
116. Meijer RI, Serne EH, Smulders YM, van Hinsbergh VW, Yudkin JS, Eringa EC. Perivascular adipose tissue and its role in type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Curr Diab Rep.* 2011; 11(3):211-7.
117. Police SB, Thatcher SE, Charnigo R, Daugherty A, Cassis LA. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(10):1458-64.
118. Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M, et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation.* 2009; 119(12):1661-70.
119. Eringa EC, Bakker W, van Hinsbergh VW. Paracrine regulation of vascular tone, inflammation and insulin sensitivity by perivascular adipose tissue. *Vascul Pharmacol.* 2012 May-Jun; 56(5-6):204-9.
120. Rittig K, Staib K, Machann J, Böttcher M, Peter A, Schick F et al. Perivascular fatty tissue at the brachial artery is linked to insulin resistance but not to local endothelial dysfunction. *Diabetologia.* 2008; 51(11):2093-9.
121. Feldon SE, O'loughlin CW, Ray DM, Landskroner-Eiger S, Seweryniak KE, Phipps RP. Activated human T lymphocytes express cyclooxygenase-2 and produce proadipogenic prostaglandins that drive human orbital fibroblast differentiation to adipocytes. *Am J Pathol.* 2006; 169(4):1183-93.
122. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res* 2009; 104(4):541.
123. Payne GA, Borbouse L, Kumar S, Neeb Z, Alloosh M, Sturek M, et al. Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a protein kinase C-beta pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(9):1711-7.
124. Takaoka M, Suzuki H, Shioda S, Sekikawa K, Saito Y, Nagai R, et al. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(8):1576-82.
125. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, Pache JC, Velebit V, Dayer JM, et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(12):2594-9.

126. Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension*. 2009; 54(6):1384-92.
127. Sacks HS, Fain JN. Human epicardial fat: what is new and what is missing? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2011; 38(12):879-887.
128. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003; 108(20):2460-6.
129. Redman LM, Ravussin E. Endocrine alterations in response to calorie restriction in humans. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 299(1):129-36.
130. Howell A, Chapman M, Harvie M. Energy restriction for breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*. 2009; 181:97-111.
131. López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(6):1768-73.
132. Liu D, Pitta M, Mattson MP. Preventing NAD(+) depletion protects neurons against excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1147:275-82.
133. Kamel EG, McNeill G, Van Wijk MC. Change in intra-abdominal adipose tissue volume during weight loss in obese men and women: correlation between magnetic resonance imaging and anthropometric measurements. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; 24(5):607-13.
134. Seidell JC. Environmental influences on regional fat distribution. *Int J Obes*. 1991; 15 Suppl 2:31-5.
135. Varady KA, Bhutani S, Klempel MC, Kroeger CM. Comparison of effects of diet versus exercise weight loss regimens on LDL and HDL particle size in obese adults. *Lipids Health Dis*. 2011; 10:119.
136. Saris WH. Effects of energy restriction and exercise on the sympathetic nervous system. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995; 19 Suppl 7:S17-S23.
137. Zorba E, Cengiz T, Karacabey K. Exercise training improves body composition, blood lipid profile and serum insulin levels in obese children. *J Sports Med Phys Fitness*. 2011; 51(4):664-9.
138. Lamarche B, Després JP, Moorjani S, Nadeau A, Lupien PJ, Tremblay A, et al. Evidence for a role of insulin in the regulation of abdominal adipose tissue lipoprotein lipase response to exercise training in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1993; 17(5):255-61.
139. Tremblay A, Nadeau A, Després JP, St-Jean L, Thériault G, Bouchard C. Long-term exercise training with constant energy intake. 2: Effect on glucose metabolism and resting energy expenditure. *Int J Obes*. 1990; 14(1):75.
140. Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res*. 2006; 53(6):482-91.
141. Enerbäck S. Human brown adipose tissue. *Cell Metab*. 2010; 11(4):248-52.
142. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. New powers of brown fat: fighting the metabolic syndrome. *Cell Metab*. 2011; 13(3):238-40.
143. Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1801(3):372-6.
144. Farmer SR. Brown fat and skeletal muscle: unlikely cousins? *Cell*. 2008; 134(5):726-7.
145. Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, et al. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(1):143-8.
146. Townsend KL, Tseng YH. Brown adipose tissue. Recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte* 2012; 1(1):13-24.

The role of the catecholaminergic pathway in heart development: beyond neuromodulatory actions

Catalina Hernández-Sánchez, Patricia Vázquez, Flora de Pablo*

3D Lab (Development, Differentiation, Degeneration). Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040. Spain

*e-mail: fdepablo@cib.csic.es

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 2 (2014), pag. 347-361.

ABSTRACT

Hormones are expressed during development in unexpected locations and stages, and this fact relates to their distinct functional roles in the embryo. In recent work, we found that the expression of Tyrosine Hydroxylase (TH, first enzyme of the catecholamine synthetic pathway) and the presence of catecholamines, antecede neural innervation in some tissues. We focus this overview on the vertebrate developing heart. TH transcripts were present in early cardiogenesis, and adrenergic as well as dopaminergic receptors were found in the cardiac region of chick embryos. We found direct effects of dopamine on cardiac gene expression and we have advanced in revealing the function of catecholamines on cardiac patterning.

Keywords: tyroxine hydroxylase; catecholamines; dopamine; cardiogenesis.

RESUMEN

El papel de las catecolaminas en el desarrollo del corazón: más allá de sus acciones neuromoduladoras

Las hormonas están expresadas durante el desarrollo en etapas y localizaciones inesperadas y este hecho se relaciona con sus distintas funciones en el embrión. Recientemente, hemos encontrado que la expresión de la Tirosina Hidroxilasa (TH, el primer enzima de la ruta de síntesis de catecolaminas) y la presencia de catecolaminas, anteceden a la inervación neural en algunos tejidos. Este artículo está centrado en el desarrollo del corazón de vertebrados. Los transcritos de TH se expresan durante la cardiogénesis temprana y se encontraron receptores dopaminérgicos y adrenérgicos en la región cardiaca del embrión de pollo. Hemos

demostrado efectos directos de la dopamina sobre la expresión de genes cardiacos y hemos avanzado en caracterizar una función de las catecolaminas sobre la formación del patrón del corazón.

Palabras clave: tirosina hidroxilasa; catecolaminas; dopamina; cardiogénesis.

1. INTRODUCTION

Hormones and neurotransmitters synthesis localized, under traditional views, within the endocrine and nervous systems, respectively. In contrast, others and we have found expression of hormones much earlier in development than the emergence of the endocrine gland specialized in their secretion takes place. For example, growth hormone, secreted in adult organisms by the pituitary gland, is detected in the blastocyst and many extrapituitary tissues during development (1).

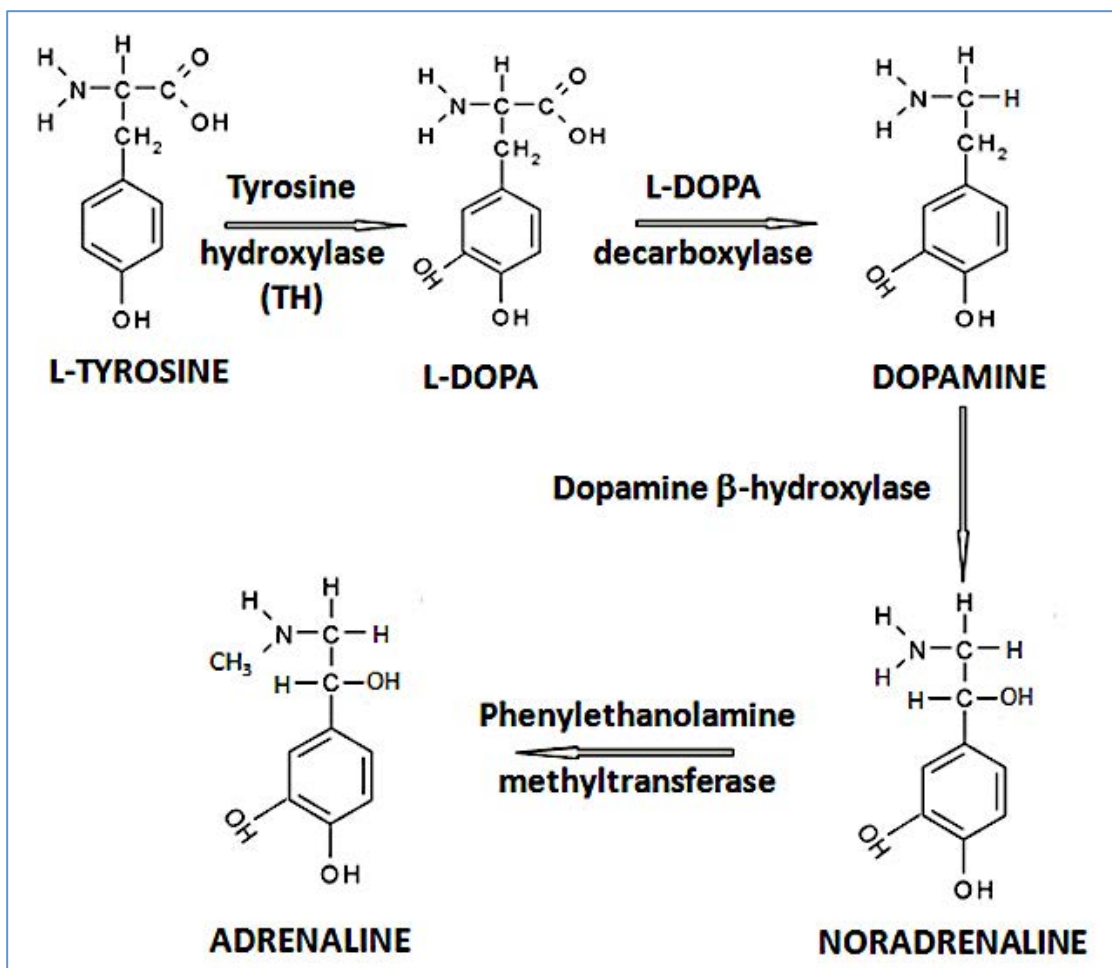


Figure 1. The catecholamine biosynthesis pathway. Note that TH is the rate-limiting enzyme and that in developing tissues the pathway may not lead to the production of all three catecholamines.

It appears that tissue GH may act in paracrine or autocrine fashion to control proliferation and differentiation, although a full characterization is not available. In studies carried out over the last three decades, we showed that the expression of proinsulin (molecular precursor form of insulin) antecedes the development of the pancreas (2, 3) and it has a cell survival function in the developing nervous system (4, 5). Proinsulin expression is tightly regulated as well in the heart tube, and malformations are induced when proinsulin is disproportionately high at early stages (6).

Catecholamines are well known essential hormones/neurotransmitters during postnatal life, when they have cardiovascular, neuromuscular and behavioral effects, but their function in specific organs during vertebrate development is poorly characterized (7). The catecholamine synthetic pathway (Figure 1) is initiated by the action of Tyrosine Hydroxylase (TH) which catalyses the conversion of the amino acid L-tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA); in subsequent reactions, dopamine, noradrenaline and adrenaline may be produced. While we were studying proinsulin transcripts regulation in development we found, to our surprise, non-canonical th-insulin chimeric mRNA transcripts (8); this finding motivated further work on the presence and function of TH in early embryogenesis.

2. TYROXINE HYDROXYLASE, A GENE WITH COMPLEX TRANSCRIPTIONAL REGULATION

As commented above, genes/proteins have mechanisms of regulation and functions at certain developmental stages of vertebrates distinct from their canonical roles later in life. In this context, while the th and ins genes are located in tandem in the same orientation (and they are generally transcribed independently), two chimeric transcripts containing exons from both of these genes can also be produced in a regulated manner during the first few days of development in the chick and quail embryos (Figure 2).

It is estimated that between 2 and 5% of tandem human genes may be transcribed into chimeric mRNAs (9-11), although the function of these unusual transcripts is in general unknown.

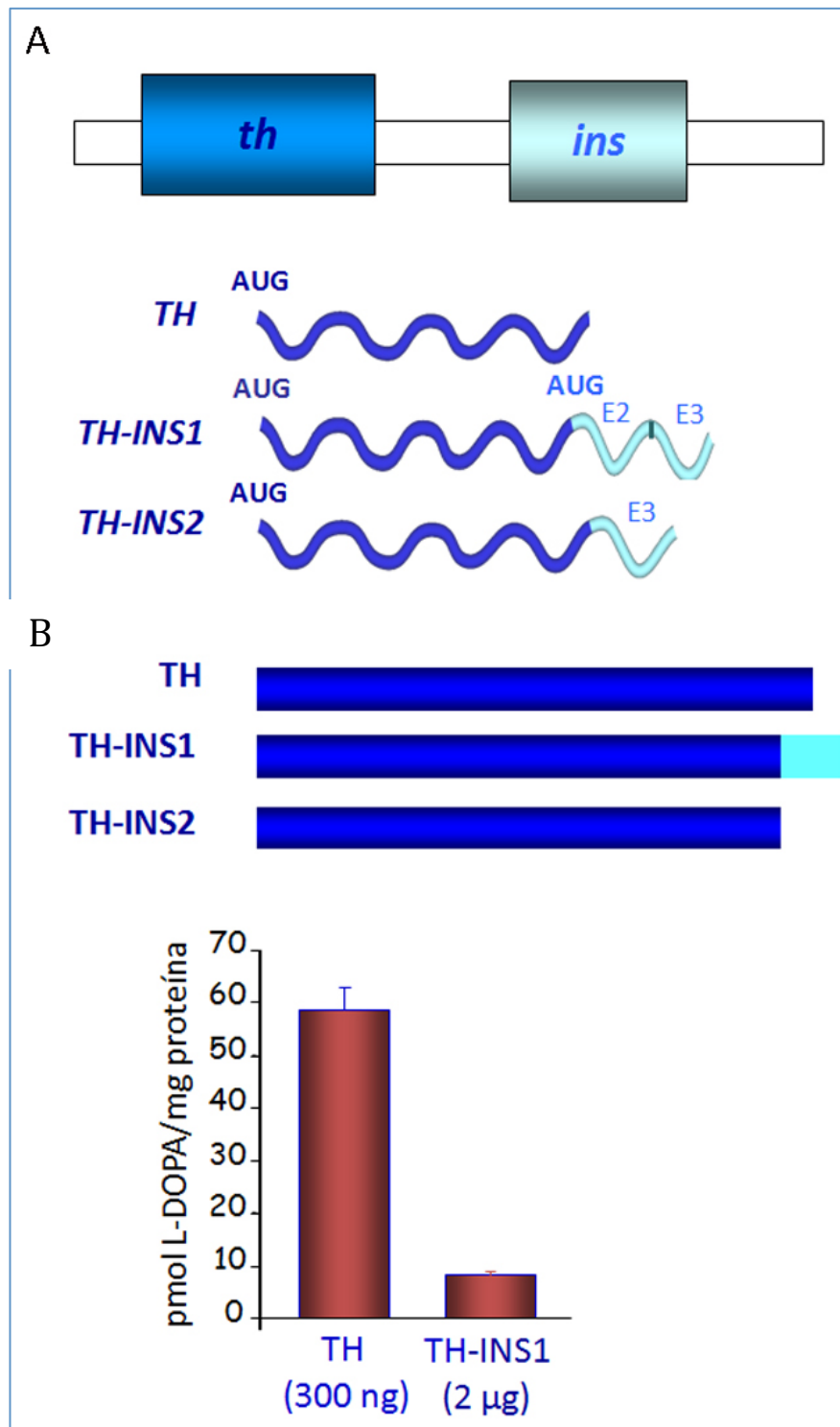


Figure 2. Novel forms of gene regulation in the *th-ins* locus. A) The schematic genomic organization of the chicken *th-ins* locus (there is a similar cluster in mammals although the transcriptional regulation may be different) and diagram of the transcripts generated by the out-of-frame splicing between *th* exon 13 and exon 2 or 3 of the insulin gene. B) TH isoforms generated and their enzymatic activity was analyzed by HPLC for L-DOPA production. The extracts of transfected HEK293T cells with these TH isoforms show a lower enzymatic activity than the canonical TH. (Modified from [8])

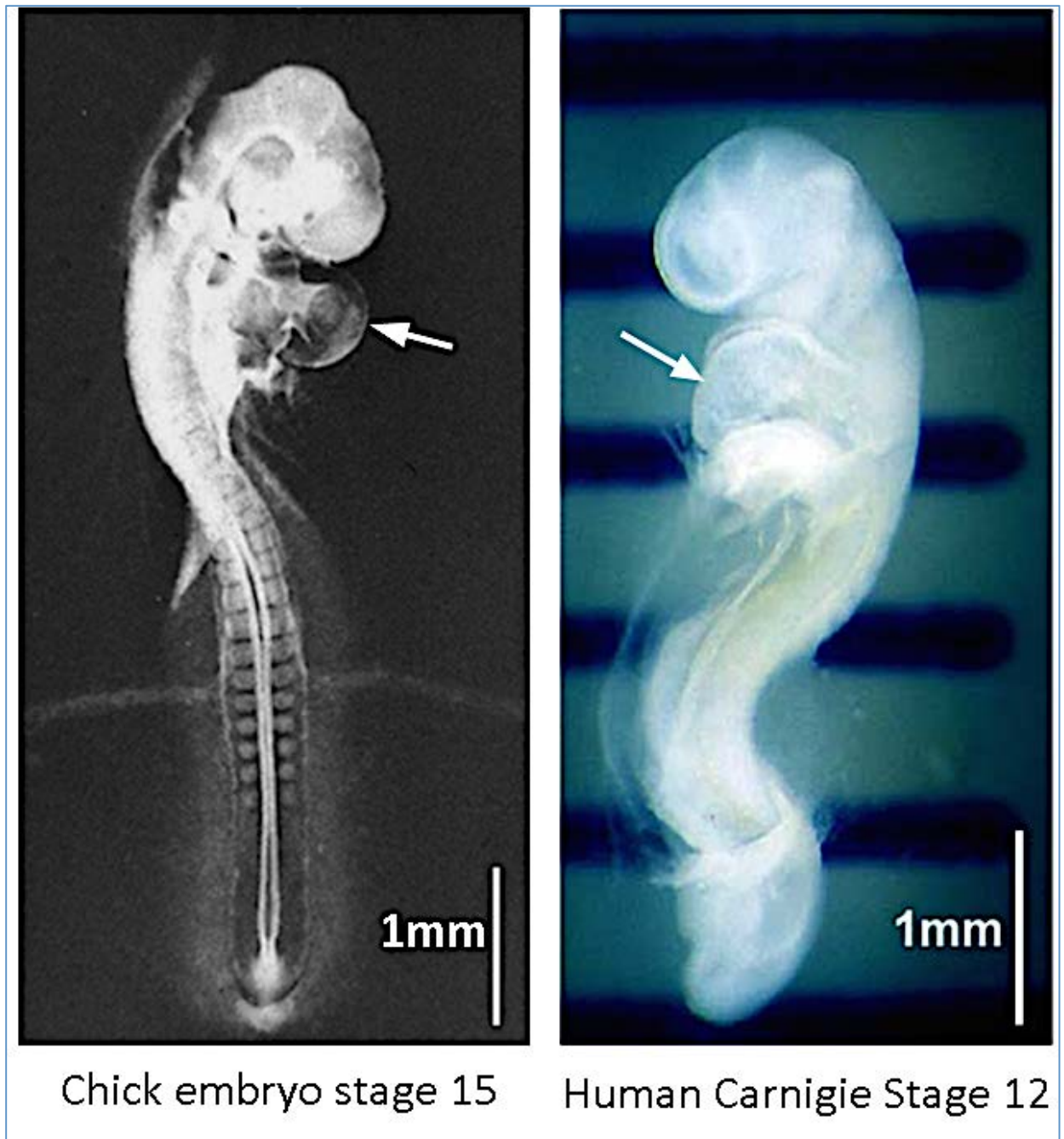


Figure 3. The chick and the human embryos at early stages of cardiogenesis. The chick embryo reaches the stage 15 ([16]) at ~2.5 days of incubation. The heart tube is already turned and specified in auricular and ventricular regions. The human embryo reaches the stage 12 (Carnegie classification, http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Carnegie_Stages) at 26-30 days of pregnancy. The heart prominence is indicated by the arrow. Note the great similarity of both embryos at these stages.

The chimeric transcripts containing exons from *th* and *ins* genes give rise to two novel isoforms of the TH protein (TH-INS1 and 2) with markedly reduced functionality, when compared to the canonical TH. The levels of L-DOPA in cells expressing TH-INS1 are approximately 5-fold lower than those found in cells expressing similar or lower amounts of TH protein (Figure 2). In addition, the TH-

INS1 chimeric mRNA also generates a small amount of insulin (8). Besides this unusual post-transcriptional regulation, the th gene displays an unexpected expression pattern.

We found that the expression of th mRNA in the chick embryo antecedes development of the nervous system. th transcripts were detected from gastrulation onwards, and they were enriched in the cardiogenic region. Before focusing this overview in the heart TH during cardiogenesis, it is worth however to emphasize the remarkably similar features of a human embryo and a chick embryo during that period (Figure 3). In vertebrates, the heart is initially formed by the fusion of the two bilateral endocardial tubes arising from the splanchnic lateral plate mesoderm. The resultant primitive heart tube, located at the ventral midline of the organism, undergoes a complex series of movements and tissue remodeling events that leads to the formation of the mature chambered organ (12).

3. USE OF THE CHICK EMBRYO AS A MODEL FOR STUDYING THE ROLE OF TH IN CARDIOGENESIS

As very clearly stated by Brand (in a kind editorial comment of our work, 13), “despite its evolutionary distance to mammals, the chick embryo is a valuable model to work out the mechanism of cardiac specification. The embryo is large and accessible and, therefore, manipulations at the time of cardiac specification and early heart formation are easily performed”. Research in the last two decades utilizing this model organism has identified several signaling molecules that are important for cardiac induction (14).

The fact that the chick embryo can be accessed and manipulated without disrupting early development, allows to perform experiments of gain of function and loss of function starting during gastrulation, and to analyze the effects on embryonic organogenesis (Figure 4). Factors or antibodies may be added and, if the aim is to look for effects over the next several days, the embryo can be reached through a window in the shell and incubation can continue. To look for short-term effects, as in the series of studies reviewed here, the addition of molecules or plasmid DNA was carried out maintaining the embryo in culture under specific tension conditions (15). The chick embryos were treated at stages 3-5 (12-22 hours of development, according to Hamburger and Hamilton (16) and were studied at stages 11-12 (less than 50 hours of development). The addition of dopamine or enzymatic inhibitors of TH activity could be carried out using heparin or resin microbeads, implanted in the embryo underneath the epiblast (Figure 4B). The uptake by the embryo tissues of plasmid DNA containing TH, GFP (Green Fluorescence Protein) or TH antisense-morpholino DNA was facilitated by electroporation (Figure 4C).

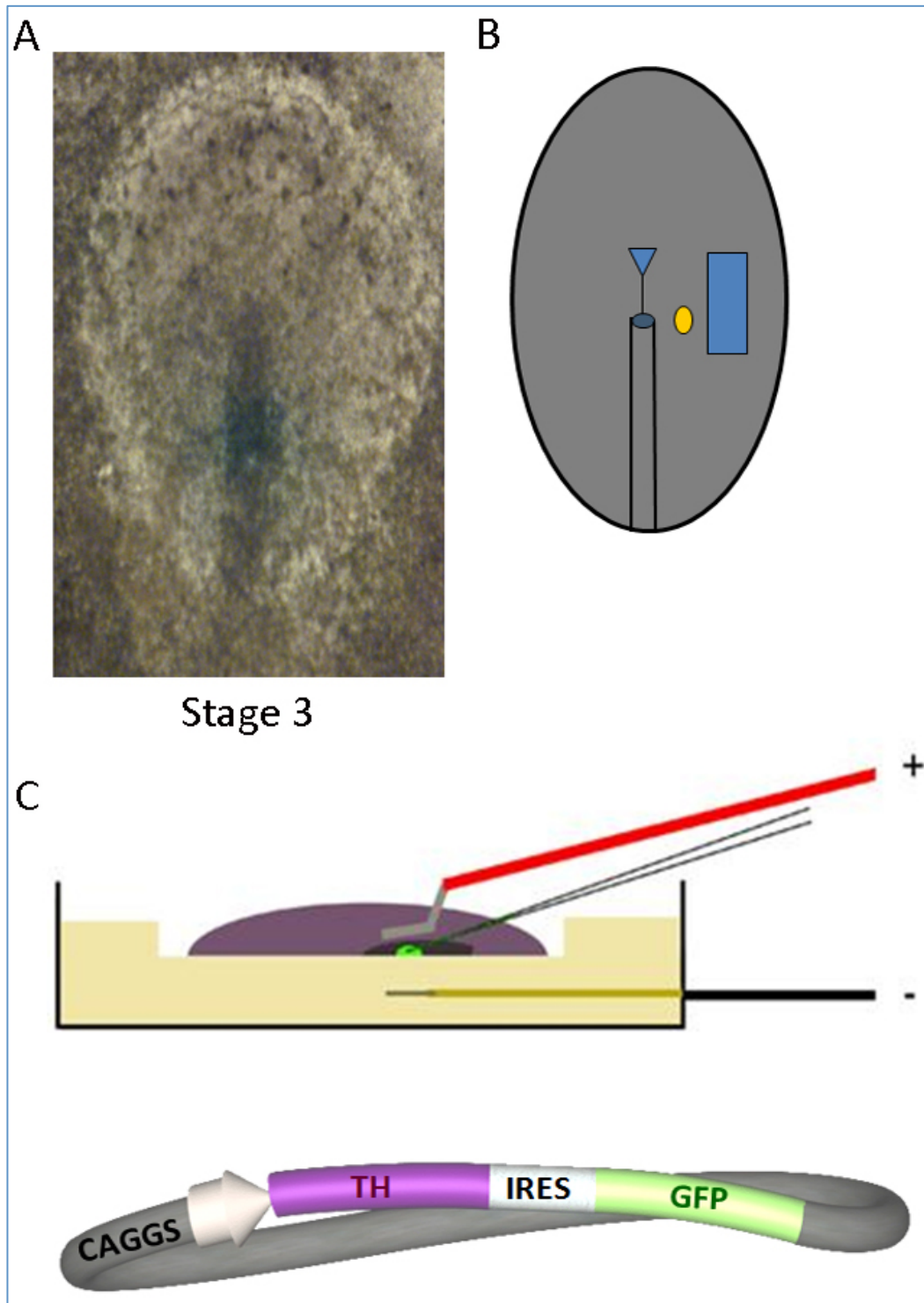


Figure 4. Techniques to manipulate gene expression in the chick embryo: implanted microbeads and electroporation. A) The stage 3-5 blastoderm can be accessed *in ovo* and B) a factor-coated microbead (yellow circle) can be implanted at the desired location lateral to the heart field of one side (blue square). After 6-18 h of further incubation the embryo can be retrieved and processed for RNA or protein detection. C) The blastoderm can also be placed in culture and injected and electroporated with DNA constructs, such as that shown in schematic form, in which the sequences of TH and the green fluorescence protein (GFP) are linked by an IRES (Internal Ribosome Entry Site). After 18-36 h of additional incubation, embryos can be collected and processed.

TH as well as adrenergic and dopaminergic receptors are expressed in the chick embryo developing heart.

We have found that *th* mRNA expression is enriched in the cardiac field of gastrulating chick embryos. By stages 8-10, it was restricted to the splanchnic mesoderm of both endocardial tubes and was subsequently (stages 11-12) expressed predominantly in the myocardial layer of the atrial segment (Figure 5, (13)). The levels of *th* mRNA in the heart increased several fold between stage 8 and stage 12 (Figure 5).

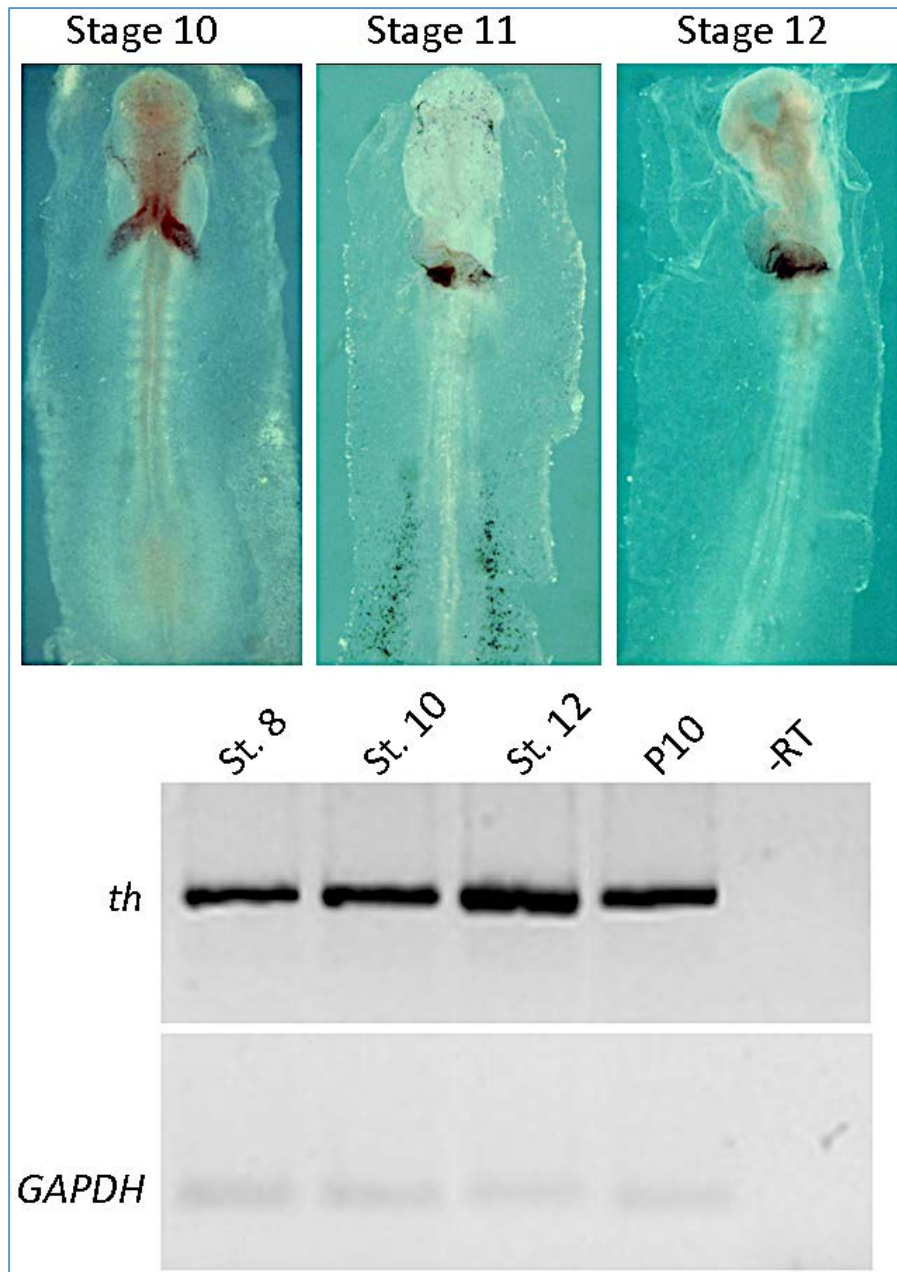


Figure 5. Tyrosine hydroxylase expression in the chick embryonic heart. In the upper panel, whole mount in situ hybridization for stages 10 to 12 are shown. Note the restricted expression in the heart tube. In the lower panel RT-PCR of *th* mRNA expression is shown in the developing endocardial tube (stage 8) and heart tube (stages 10 and 12) and postnatal day 10 (P10) heart. An internal control with *GAPDH* is shown below. (Modified from [13]).

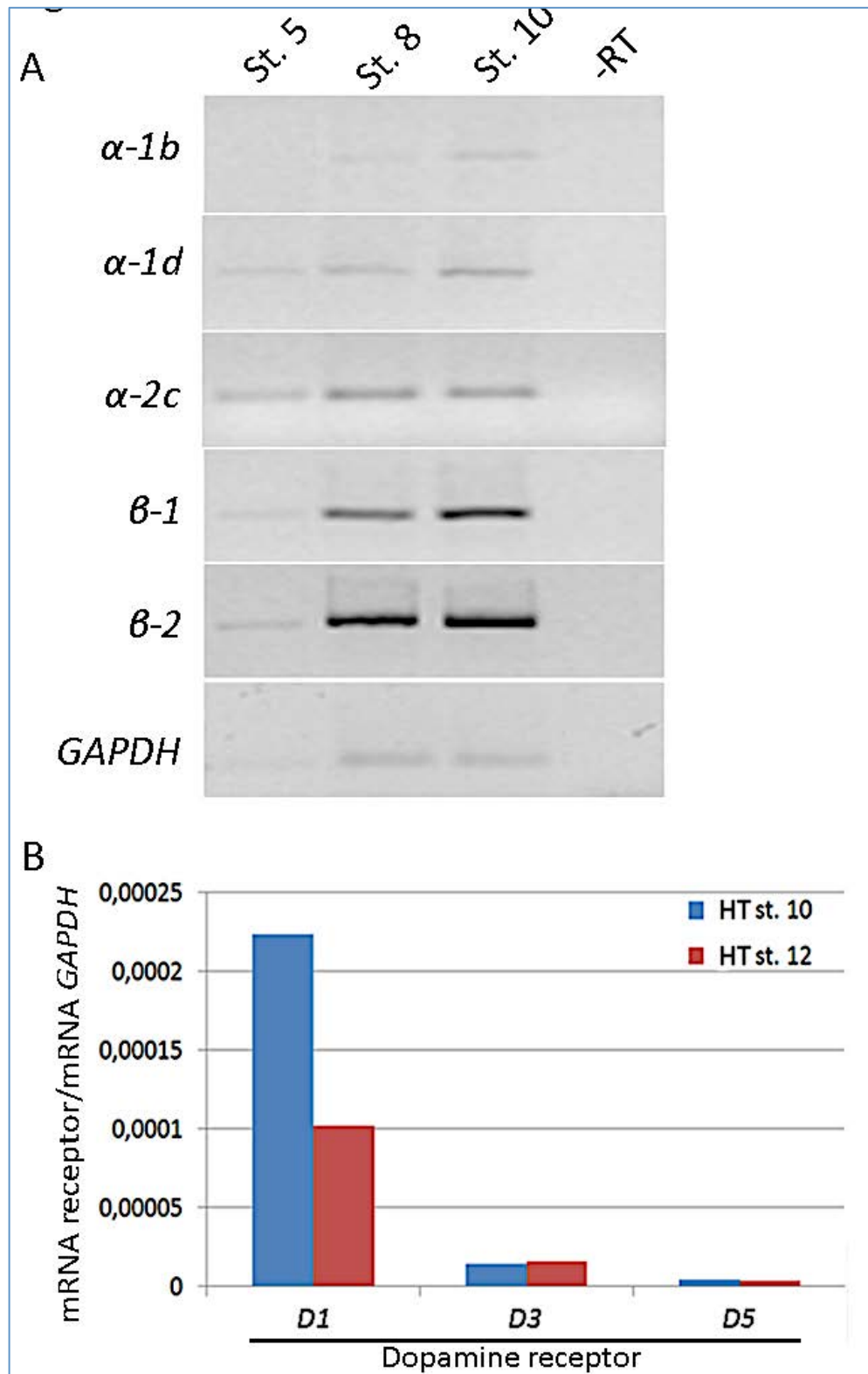


Figure 6. Expression of receptors in the chick embryonic heart regions. A) Analysis of adrenergic receptors (α -1b, α -1d and α -2c ; β -1 and β -2) expression by RT-PCR of mRNA from the precardiogenic area (stage 5), endocardial tubes (stage 8) or heart tube (stage 10). An internal control with *GAPDH* is shown below. B) Analysis of dopaminergic receptors (D1, D3 and D5) expression by quantitative PCR of mRNA from stage 10 and 12 heart tubes. The levels of dopamine receptor transcripts were normalized relative to *GAPDH* mRNA levels. Primers are shown in Tables 1 and 2.

We set out, then, to demonstrate the presence of receptors which may mediate the action of catecholamines, likely produced by the cardiomyocytes of the primitive heart tube. Adrenergic and dopaminergic receptors are 7-transmembrane domain G protein-coupled receptors. The family of adrenergic receptors are composed by α - and β -receptors. There are two types of α -receptors: The stimulation of α -1-receptors (α -1a, α -1b and α -1d subtypes) activates the $G_{\alpha q}$ subunit of G proteins and, therefore, Phospholipase C is activated. In contrast, the α -2-receptors (α -2a, α -2b, and α -2c subtypes) are coupled to $G_{\alpha i/o}$ subunit and, therefore, inactivate adenylyl cyclase (AC). In contrast, the β -adrenergic-receptors family includes three subtypes: β -1, β -2, β -3, which activate the subunit $G_{\alpha s}$ and subsequently increase the intracellular cAMP levels. However, the β -2 adrenergic receptors may activate the $G_{\alpha i}$ and $G_{\beta\gamma}$ subunits of G protein in some cases.

The dopaminergic receptors are classified into two subfamilies. The D1-receptors (D1, D5) are coupled to $G_{\alpha s}$ proteins and their activation leads to stimulation of AC and subsequent increase in cAMP levels. On the contrary, the D2-receptors (D2, D3, D4) are coupled to $G_{\alpha i}$ proteins and their activation leads to inhibition of AC and decrease of cAMP levels. Members of the D1 and D2 receptors can form heterodimers that are coupled to $G_{\alpha q}$ proteins and their activation leads to stimulation of phospholipase C and intracellular calcium release.

Our preliminary studies showed the presence of adrenergic (both α and β types) and dopaminergic receptors (D1 and D2 subfamilies) in the heart tube (Figure 6) suggesting that catecholamines have the possibility to act through them. Further studies are needed to confirm the role of the specific receptor subtypes and signaling pathways in cardiogenesis.

4. L-DOPA AND DOPAMINE INDUCE CARDIAC DIFFERENTIATION

Differentiation of contracting cardiomyocyte requires the action of a combination of transcription factors, including Nkx2.5 and Tbx5 (17). The pattern of the expression suggested that catecholamines may play a role in cardiac development. Implanting microbeads soaked in L-DOPA and dopamine, laterally to one of the bilateral heart fields in cultured chick embryos, we could show that both L-DOPA and dopamine induce cardiac muscle differentiation. Cardiac transcription factors Nkx2.5 and Tbx5 were expressed in the ectopic tissue generated near the microbead (Figure 7A). Additionally, the sarcomeric protein AMHC1 (atrial myosin heavy chain), marker of terminal cardiac differentiation, was also induced, as reflected by in situ hybridization and immunostaining with MF20 antibody (Figure 7A). Moreover, the cells of the induced ectopic tissue developed myofibrils organized into sarcomeres, similar to those found in the cardiomyocytes of the primitive heart tube (Figure 7B). The link of TH to cardiac differentiation programs

was further confirmed by blocking the endogenous synthesis of L-DOPA and dopamine, which led to a decrease in expression of AMHC1 (13).

Table 1. Sequence of the primers used in semiquantitative PCR.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Th</i>	CACGAGTGAAGATGCCAAC	CACGAGTGAAGATGCCAAC
<i>α-1b</i>	AAAGAAGGCAGCCAAGACA	GAAAGAGCTGGGGTTTTTCC
<i>α-1d</i>	CTTCTTCGTCCTGCCTTTTG	AGGAGCTGTTTCAGGGTGCTA
<i>α-2c</i>	AGAGCAGCACCTCAGAGAGC	GGCTACTGGAGTGCTTGGAG
<i>β-1</i>	CCAAGGAGCAGATCAGGAAG	GCCCAACCAGTTGAAGAAAA
<i>β-2</i>	CGAGTTCTGGACCTCTCTGG	GGGTCTTCAGAGCTTTGTGC
<i>gapdh</i>	GCAATGCATCGTGCACCACC	TGTGATGGCATGGACAGTGG

Table 2. Sequence of the primers used in quantitative PCR with Roche probes.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Roche probe
<i>D1</i>	TGTCATTAGTGTGGACAGATACTG G	GGGTCATTTTCCTCTCGTACC	19
<i>D3</i>	GATAAGCTCTTTAGGAAGGATAG GC	CCTAATACAGAGAGCCACTCCA C	12
<i>D5</i>	GTCTGCTGCACTGGAGGTC	GAATCGTTTCGTCTCCGTAGG	27
<i>gapdh</i>	GTCCTCTCTGGCAAAGTCCA	ACCATGTAGTTCAGATCGATG AA	49

Interestingly, in a parallel study, carried out with mouse embryonic stem cells, the addition of L-DOPA and dopamine enhanced cardiac myocyte differentiation (international patent presented by Hernández Sánchez, C., Bártulos Encinas, O., De Pablo Dávila, F., Aránega Jiménez, A. on “The use of catecholamine for the differentiation of stem cells to cardiomyocytes”. PCT/ES09/070339).

Overexpression and knock-down of TH disrupts cardiac markers gene expression and affects chamber formation

We set out gain-of-function experiments using constructs that led to overexpression of TH together with GFP (Figure 4), or just GFP as a control, in electroporated chick embryos. One of the first features of anterior-posterior patterning is the restriction of the ventricular (VMHC-1) and atrial (AMHC-1) myosin heavy chain to the anterior and posterior pole, respectively, of the primitive heart tube (18-20).

We showed that TH overexpression increased and expanded the expression of the posteriorly restricted genes AMHC-1 and Tbx5 toward more rostral regions (Figure 8). These results suggested that TH is involved in the heart tube patterning by specifying the atrial region. In addition, TH also had major functional

consequences, since the electroporated chick embryos displayed slower (53 vs. 100 beats per minute) and arrhythmic heart beats compared to controls (13). The use of morpholino-oligonucleotides against *th* mRNA allowed the knock-down of its expression in the chick embryo, leading to a decrease in *AMHC1* and *Tbx5* expression together with an atrophic sinoatrial region and oversized ventricular region (13). Thus, TH action not only induces cardiac differentiation *in vivo* but the catecholamine pathway regulates heart patterning, conferring atriogenic identity.

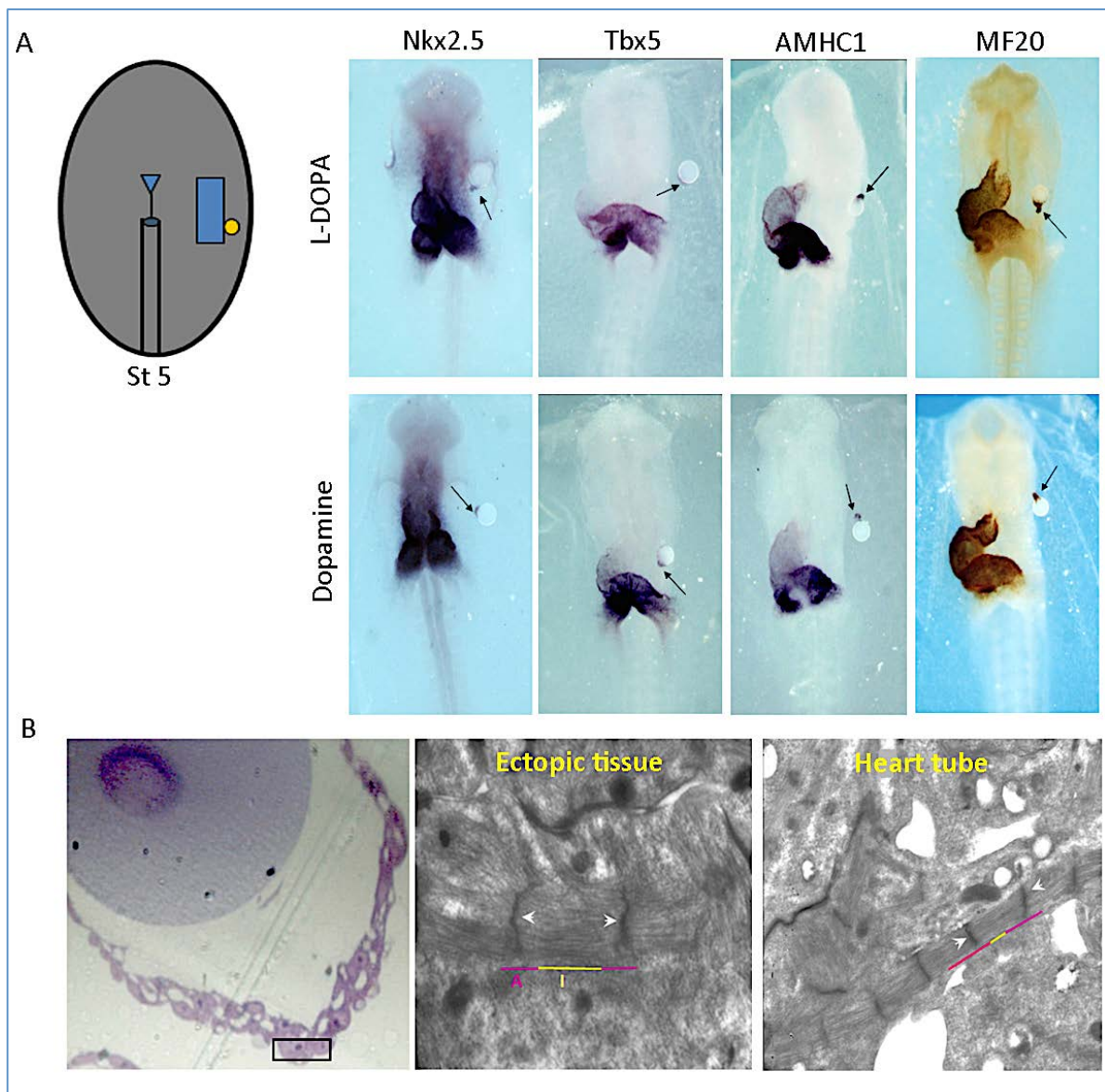


Figure 7. Induction of cardiac genes and cardiomyocytes differentiation by L-DOPA and Dopamine. A) Drawing corresponds to a stage 5 embryo scheme with a microbead implanted. Beads were soaked with either PBS (vehicle), or a solution of 10 $\mu\text{mol/L}$ L-DOPA or dopamine. Stage 10-12 chick embryos were subjected to whole-mount in situ hybridization for the genes indicated (*Nkx2.5*, *Tbx5*, *AMHC1*) or immunohistochemistry for *MF20*. Ectopic tissue adjacent to the bead coated with L-DOPA or dopamine (arrow) expressed all markers. PBS did not induce any signal (not shown). B) Ultrastructure of the ectopic tissue induced. The white arrowheads indicate the Z bands and the purple and yellow lines delineate I and A bands of the cardiomyocytes adjacent to the bead. (Modified from [13]).

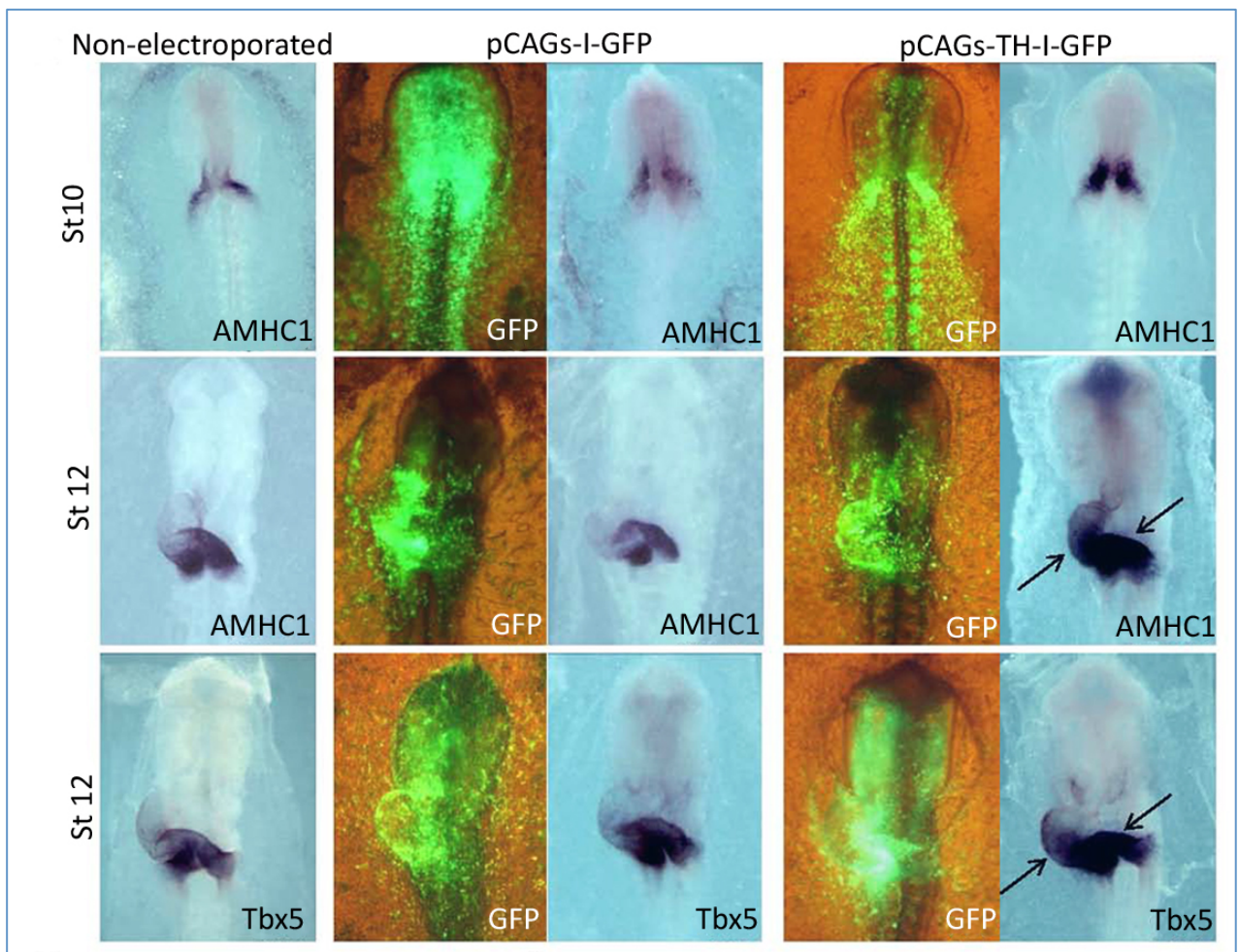


Figure 8. Effect of TH on anterior-posterior heart tube patterning and specification of chambers. Effect of TH gain-of-function on sino-atrial gene expression. Embryos from stages 10 or 12 underwent in situ hybridization for the indicated gene markers, AMHC1 and Tbx5. The control non-electroporated embryos are compared with embryos electroporated with either the control construct (pCAGs-I-GFP) or with the *th* expressing construct (pCAGs-TH-I-GFP). The anterior expanded expression of AMHC1 and Tbx5 in the heart tube is indicated by the black arrows. Visualization of GFP expression for the embryos electroporated is shown in the corresponding left panels. (Modified from [13]).

It is worth mentioning that the *th* global knockout mice, generated in 1995 by the group of Dr. Palmiter (21), is embryonic lethal starting at day E11.5-12.5. Although, the null mice die from apparent heart failure, a detailed characterization of the mouse embryo phenotype in organogenesis has not been carried out yet. This type of study would be required to unravel the role of catecholamines in mouse cardiogenesis.

5. CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS

The morfological and functional diversity of animal organisms depends on multiple mechanisms of gene regulation, especific in time and space, which permit the functional utilization of related transcripts (and their protein products) in distinct contexts along the life cycle. We have characterized the role of TH in cardiac development, focusing in the primitive heart tube formation. In the future we will try to define the mechanism of dopamine action and the receptors involved in cardiomyocyte differentiation.

It is intriguing as well the possible role of TH in the proepicardium, a transient structure in which we have found expression in later stages of cardiac organogenesis. In addition, TH is expressed in the mouse pancreatic primordium since its formation. We are now characterizing the expression pattern of TH during pancreas development, and the likely participation of catecholamines in differentiation programs leading to pancreatic endocrine cells. The field of the action of catecholamines in non-neural tissues development has turned out to be much broader than anticipated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank present and past members of the laboratory, especially Enrique J. de la Rosa and Teresa Suárez, for their contribution to scientific discussions, the background data and specific figures modified for this article. This research was funded by grants BFU 2007-61055 and BFU 2010-15868 (MINECO) to F. de Pablo. PV is supported by a JAE-DOC contract from the CSIC.

REFERENCES

- (1) Harvey S. Extrapituitary growth hormone. *Endocrine* 38: 335-359 (2010).
- (2) Hernandez-Sanchez C; Lopez-Carranza A; Alarcon C; de La Rosa EJ, de Pablo F. Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 9834-9838 (1995).
- (3) de Pablo F; Roth J. Endocrinization of the early embryo: an emerging role for hormones and hormone-like factors. *Trends in biochemical sciences* 15: 339-342 (1990).
- (4) Hernandez-Sanchez C; Mansilla A; de la Rosa EJ; de Pablo F. Proinsulin in development: New roles for an ancient prohormone. *Diabetologia* 49: 1142-1150 (2006).
- (5) de la Rosa EJ; de Pablo F. Proinsulin: from hormonal precursor to neuroprotective factor. *Frontiers in molecular neuroscience* 4: 20 (2011).
- (6) Martinez-Campos E; Hernandez-SanMiguel E; Lopez-Sanchez C; De Pablo F, Hernandez-Sanchez C. Alternative splicing variants of proinsulin mRNA and the effects of excess proinsulin on cardiac morphogenesis. *FEBS letters* 587: 2272-2277 (2013).
- (7) Pendleton RG; Rasheed A; Roychowdhury R; Hillman R. A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends in pharmacological sciences* 19: 248-251 (1998).
- (8) Hernandez-Sanchez C; Bartulos O; Valenciano AI; Mansilla A; de Pablo F. The regulated expression of chimeric tyrosine hydroxylase-insulin transcripts during early development. *Nucleic acids research* 34: 3455-3464 (2006).

- (9) Akiva P; Toporik A; Edelheit S; et al. Transcription-mediated gene fusion in the human genome. *Genome research* 16: 30-36 (2006).
- (10) Kim N; Kim P; Nam S; Shin S; Lee S. ChimerDB--a knowledgebase for fusion sequences. *Nucleic acids research* 34: D21-24 (2006).
- (11) Parra G; Reymond A; Dabbouseh N; et al. Tandem chimerism as a means to increase protein complexity in the human genome. *Genome research* 16: 37-44 (2006).
- (12) Buckingham M; Meilhac S; Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature reviews* 6: 826-835 (2005).
- (13) Lopez-Sanchez C; Bartulos O; Martinez-Campos E; et al. Tyrosine hydroxylase is expressed during early heart development and is required for cardiac chamber formation. *Cardiovascular research* 88: 111-120 (2010).
- (14) Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Developmental biology* 258: 1-19 (2003).
- (15) Chapman SC; Schubert FR; Schoenwolf GC; Lumsden A. Anterior identity is established in chick epiblast by hypoblast and anterior definitive endoderm. *Development (Cambridge, England)* 130: 5091-5101 (2003).
- (16) Hamburger V; Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88: 43 (1951).
- (17) Takeuchi JK; Bruneau BG. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459: 708-711 (2009).
- (18) Oana S; Machida S; Hiratsuka E; et al. The complete sequence and expression patterns of the atrial myosin heavy chain in the developing chick. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 90: 605-613 (1998).
- (19) Somi S; Klein AT; Houweling AC; et al. Atrial and ventricular myosin heavy-chain expression in the developing chicken heart: strengths and limitations of non-radioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 54: 649-664(2006).
- (20) Yutzey KE; Rhee JT; Bader D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. *Development (Cambridge, England)* 120: 871-883 (1994).
- (21) Zhou QY; Quaife CJ; Palmiter RD. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 374: 640-643 (1995).

Estudio de la actividad neuroprotectora de diterpenos aislados del género *Sideritis*

Elena M^a González Burgos, M^a Emilia Carretero Accame, M^a Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado*

Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria 28040– Madrid, España

*e-mail: egonzalezburgos@hotmail.com

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, N^o 2 (2014), pag. 362-376.

Resumen de la Tesis Doctoral premiada con el premio “Antonio Doadrio López” en el Concurso Científico 2013 de la Real Academia Nacional de Farmacia.

RESUMEN

El estrés oxidativo, definido como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del sistema defensivo del organismo (enzimático y no enzimático) para hacer frente a las mismas, está implicado en la fisiopatología de varias enfermedades neurodegenerativas incluidas la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la Esclerosis Lateral Amiotrófica. En este contexto, la búsqueda de compuestos antioxidantes que permitan disminuir o neutralizar el daño oxidativo constituye un importante campo de investigación. En este trabajo de Tesis Doctoral se ha evaluado la actividad neuroprotectora frente a estrés oxidativo de los diterpenos andalusol, conchitriol, foliol, lagascatriol, linearol y sidol aislados de especies del género *Sideritis*.

Palabras clave: diterpenos; *Sideritis*; neuroprotección.

ABSTRACT

Oxidative stress, defined as a disturbance in the equilibrium between reactive oxygen species (ROS) production and the capacity of the defense system of the organism (enzymatic and non-enzymatic) to protect against them, is involved in the physiopathology of several neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. In this context, the search of antioxidant compounds is an interesting

research field. In this Doctoral Thesis, it has been evaluated the neuroprotective activity against oxidative stress of the diterpenes andalusol, conchitriol, foliol, lagascatriol, linearol and sidol isolated from *Sideritis* spp.

Keywords: diterpenes; *Sideritis*; neuroprotection.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la Esclerosis Lateral Amiotrófica y la enfermedad de Huntington son procesos crónicos caracterizados por la pérdida progresiva de las neuronas y la consiguiente alteración de las funciones motora, sensorial y cognitiva. Estas enfermedades constituyen un problema de salud pública a nivel mundial, que crece día a día debido al vertiginoso envejecimiento de la población. La investigación básica y clínica aún esfuerzos para conocer mejor la fisiopatología de estas enfermedades así como para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas tanto para paliar como para frenar la progresión de las mismas (1, 2).

Durante las últimas décadas, numerosos estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*, así como estudios *post mortem* en tejidos cerebrales humanos, apoyan la implicación del estrés oxidativo en la patogenia de diversas enfermedades neurodegenerativas, incluidas las anteriormente mencionadas (3, 4). El estrés oxidativo, definido como una alteración de la homeostasis óxido-reducción intracelular consecuencia de una excesiva producción de ROS y/o de una deficiencia en los mecanismos antioxidantes endógenos de tipo enzimático y/o no enzimático, puede conllevar un daño celular irreversible e irreparable por mecanismos como son la peroxidación lipídica en las membranas celulares, la modificación de las bases de los ácidos nucleicos, la inactivación de las enzimas y la oxidación de las proteínas; incluso conducir a la muerte celular, principalmente por apoptosis (5, 6).

El uso de antioxidantes exógenos se presenta como una de las estrategias terapéuticas más prometedoras para disminuir o neutralizar el daño oxidativo ocasionado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (7). Los mecanismos de acción descritos que definen la capacidad antioxidante de un compuesto son diversos: a) interacción directa con especies reactivas o actividad "scavenger" de radicales libres, vía "transferencia de un solo electrón" (SET) o vía "transferencia de un átomo de hidrógeno" (HAT), b) quelación de metales de transición (hierro, cobre) que pueden iniciar reacciones de oxidación, c) inducción o activación de las enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, hemooxigenasa-1, entre otras), lo que se traduce en un mayor equilibrio redox celular y d) inhibición de la actividad, expresión o síntesis de enzimas prooxidantes como NADPH-oxidasa, mieloperoxidasa, óxido nítrico

sintasa y xantina-oxidasa, implicadas en la generación de especies reactivas (8). En este contexto, los productos naturales constituyen una fuente inagotable de principios activos con potencial antioxidante. De hecho, recientes investigaciones han demostrado la capacidad antioxidante de diversos compuestos de origen natural, siendo entre ellos relevantes el grupo de los diterpenos (9).

El género *Sideritis*, perteneciente a la familia de las Lamiaceae, comprende aproximadamente 150 especies distribuidas por la vertiente mediterránea europea, africana y parte de la asiática, extendiéndose desde las islas Canarias y Madeira hasta el Cáucaso (10). Distintas especies de *Sideritis* se han usado tradicionalmente para preparar infusiones, como agentes saborizantes así como con fines terapéuticos por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiulcerosas, digestivas, antimicrobianas, vulnerarias, analgésicas y carminativas (11). Más de 160 diterpenos, incluidos en al menos 9 grupos de estructuras diferentes, han sido identificados y aislados de las partes aéreas de *Sideritis* spp. (12). Los compuestos sideridiol y siderol fueron los primeros diterpenos aislados y su estructura se elucidó durante la segunda mitad del siglo XX (13, 14).

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha planteado como el estudio de la actividad neuroprotectora, frente al estrés oxidativo, de los diterpenos andalusol, conchitriol, lagascatriol, foliol, linearol y sidol aislados de especies del género *Sideritis* y su posible aplicación en aquellos procesos neurodegenerativos que cursen con daño celular.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Diterpenos

El diterpeno de tipo labdanoandalusol se aisló de la especie *Sideritis arborescens* Salzm. (15). Tanto el diterpeno de tipo beyerano, conchitriol, como el de tipo rosano, lagascatriol, se aislaron de *Sideritis angustifolia* Lag. (16-18). Los diterpenos derivados del kaurano, foliol, linearol y sidol se obtuvieron de *Sideritis linearifolia* Lam. (18).

2.2. Líneas celulares

2.2.1. Líneas celulares utilizadas en los estudios de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. Tratamiento celular.

Línea celular PC12 (Neuronas)

La línea celular PC12 se adquirió de la colección de cepas American Type Culture Collection (ATCC). El medio de cultivo utilizado es Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation) suplementado con 0,5% de gentamicina (Gibco, Invitrogen Corporation) y 0,2% de piruvato (Sigma-Aldrich). Las células se mantienen a 37°C en atmósfera de aire al 95% y de CO₂ al 5%.

Línea celular U373-MG (Astrocitos)

La línea celular U373-MG se adquirió desde Sigma-Aldrich procedente de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC). El medio de cultivo empleado es Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation) suplementado con 0,5% de gentamicina (Gibco, Invitrogen Corporation) y suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Invitrogen Corporation). Las células se mantienen en condiciones de temperatura y atmósfera húmeda de 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂.

Tratamiento celular

Las células U373-MG y PC12 se tratan con los diterpenos objeto de estudio (diferentes concentraciones según el propio desarrollo de la Tesis) durante 24 h, y posteriormente con H₂O₂ (1 mM para las células U373-MG y 0,1 mM para las células PC12) durante 30 minutos.

2.2.2. Líneas celulares utilizadas en los estudios de paso a través de Barrera Hemato Encefálica (BHE)

Línea celular RBE4

Las células RBE4 fueron cedidas por el Dr. Pierre Olivier Couraud del Instituto Cochin del Instituto Nacional de la Salud y de la Investigación Médica (INSERM) de París (Francia). Las células RBE4 crecen en frascos de cultivo tapizados durante al menos 3 horas con 3 mL de una solución de colágeno obtenida a partir del tendón de cola de rata. Las células se mantienen en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, saturada de humedad a 37°C. El medio de cultivo empleado es Hams F-10/ α -Minimum Essential Medium (α -MEM) (1:1) (Gibco, Invitrogen Corporation), suplementado con Glutamax (Sigma-Aldrich), 10% de suero fetal de ternero (Gibco, Invitrogen Corporation), geneticina (300 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) y factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF, 1 ng/mL) (Boehringer).

Línea celular ECV304/C6

La línea celular ECV304 corresponde a células endoteliales de cordón umbilical humano. Esta línea celular se obtuvo de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC).

La línea celular C6, procedente de células de glioma de rata, se adquirió de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC).

En este trabajo, se emplearon sistemas de cocultivos entre las líneas celulares ECV304 y C6. Estas células crecen en medio M199 (Sigma) suplementado con Glutamax (Sigma-Aldrich), 10% de suero fetal de ternero (Gibco, Invitrogen Corporation) y penicilina/estreptomicina (100 U/mL; 100 µg/mL) (Gibco, Invitrogen Corporation). Las células se mantienen en atmósfera húmeda de 5% CO₂/95% aire a 37°C.

2.3. Métodos para el estudio de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

En el presente resumen de Tesis Doctoral se muestra una pequeña parte de los métodos empleados en el estudio de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.

- **Medida de la generación intracelular de radicales libres:** Técnica de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (19). Tras los tratamientos, se añaden 200 µL/pocillo de una mezcla de una solución de 0,01 mM DCFH-DA con PBS glucosado (180 mg glucosa/100 mL PBS estéril) y se mantiene la placa en incubación durante 30 minutos a 37°C. Después de este tiempo, las células se lavan con 200 µL/pocillo de PBS glucosado y se procede a la lectura utilizando un Fluorímetro Lector de microplacas FLx800, BioTek, Instruments, Inc., en las condiciones de lectura de excitación 480 nm y de emisión 510 nm.

- **Determinación de la peroxidación lipídica** (20). Para la cuantificación de la peroxidación lipídica se miden los niveles de MDA presentes en cada muestra mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siguiendo un protocolo modificado de Grotto et al. (2007).

- **Determinación de la actividad y expresión de enzimas antioxidantes.** Las enzimas estudiadas han sido aquellas implicadas en los principales procesos de detoxificación de ROS: catalasa (21), superóxido dismutasa (22), glutatión reductasa (23) y glutatión peroxidasa (24). Se ha determinado tanto la actividad por técnicas espectrofotométricas así como la expresión proteica de cada una de ellas mediante Western blot.

- **Determinación de los niveles de calcio mitocondrial.** La concentración de calcio mitocondrial se determina midiendo la fluorescencia de Rhod-2. Después de los tratamientos, las células se lavan con medio de Krebs con calcio y sin sonda fluorescente, y a continuación se incuban durante 40 minutos a 37°C en oscuridad con medio de Krebs con calcio y con la sonda fluorescente. Después de la

incubación, las células se lavan 2 veces con medio de Krebs sin calcio y sin sonda fluorescente y se dejan incubar durante 30 minutos a la misma temperatura para permitir la hidrólisis completa del éster. La fluorescencia se mide a 37°C durante 5 minutos a una λ excitación de 552 nm y a una λ emisión de 581 nm a 37°C en un fluorímetro Spectramax Gemini EM (Molecular Devices). A continuación, se adiciona el ionóforo A23187 (5 μ M) y se mide la fluorescencia durante 15 minutos en las mismas condiciones descritas anteriormente (25).

2.4. Métodos para el estudio de paso a través de BHE

- **Estudios de permeabilidad.** El experimento de transporte se inicia con la adición de los diterpenos en un volumen de 0,5 mL en el compartimento apical (para el transporte apical a basal) y en un volumen de 1,5 mL en el compartimento basal (para el transporte basal a apical). Las placas se incuban a 37°C en agitación durante 6 h. Una vez finalizado el transporte, se toman alícuotas de los lados apical y basal, para su posterior análisis y cuantificación por HPLC (26).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis, se ha evaluado la actividad neuroprotectora de seis diterpenos andalusol, conchitriol, lagascatriol, foliol, linearol y sidol aislados del género *Sideritis* frente al estrés oxidativo inducido por exposición a H₂O₂ en los modelos celulares PC12 (modelo neuronal) y U373-MG (modelo de astrocitoma).

Para llevarlo a cabo hemos establecido, en primer lugar, las condiciones de daño oxidativo para pasar posteriormente a determinar si las moléculas en estudio protegen frente al mismo. En el estudio sobre protección celular se ha evaluado el efecto sobre la viabilidad celular, los cambios sobre la morfología celular, el nivel de ROS intracelular, los cambios sobre los marcadores de estrés oxidativo (peroxidación lipídica y ratio GSH/GSSG) y sobre la actividad y expresión de las proteínas de las principales enzimas antioxidantes implicadas en el sistema de defensa. El efecto de los diterpenos sobre diferentes marcadores de disfunción mitocondrial como son los niveles de calcio citosólico y mitocondrial, el potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ATP también han sido evaluados. Los posibles mecanismos implicados en la protección de los diterpenos en estudio frente al daño celular inducido por H₂O₂ han sido asimismo elucidados. Finalmente, se ha realizado el estudio y posible mecanismo de paso de los diterpenos a través de la BHE.

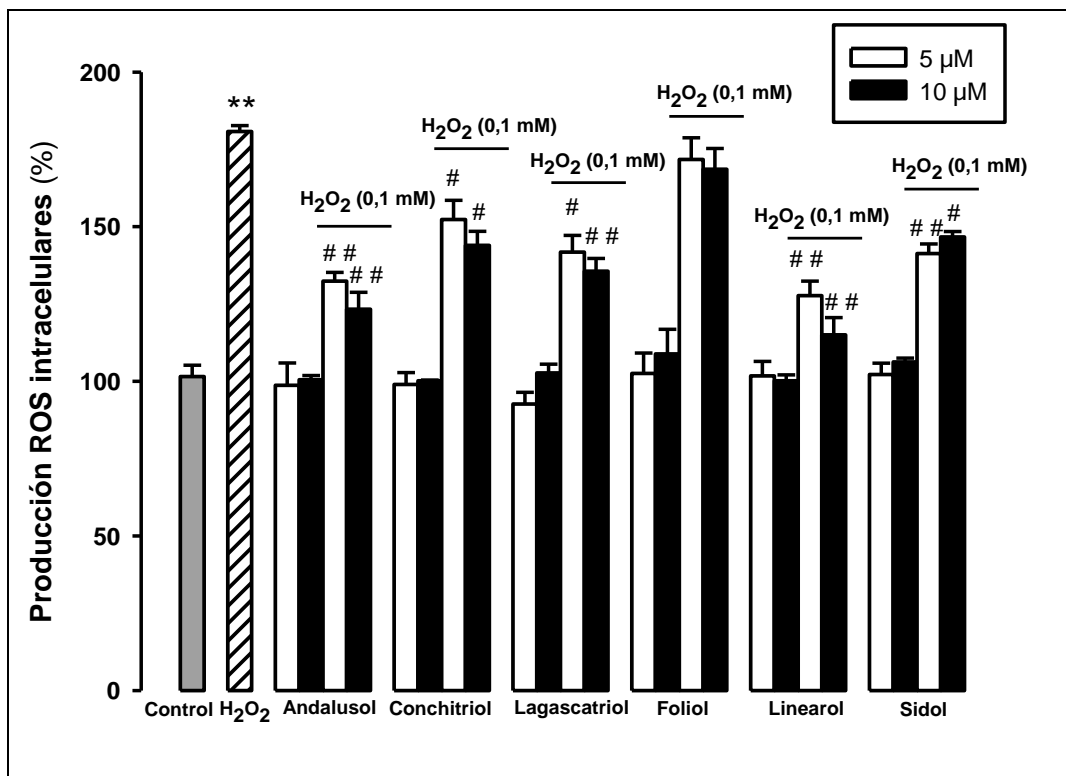
En el presente resumen de Tesis Doctoral se muestra sólo una pequeña parte de los resultados obtenidos.

El H₂O₂ ha sido la molécula utilizada como agente generador de estrés oxidativo. La formación de elevadas concentraciones de H₂O₂ se ha descrito en las

fibrillas de amiloide formadas por la proteína beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer y, por la proteína alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson, implicándose a esta especie reactiva de oxígeno como posible mecanismo causal en la muerte celular que ocurre en ambas enfermedades neurodegenerativas (27, 28). Teniendo en cuenta que el principal mecanismo de daño celular inducido por H₂O₂ implica la vía del estrés oxidativo (29), procedimos a estudiar el efecto de la exposición a H₂O₂ sobre el nivel de ROS intracelular mediante el ensayo de la diclorofluoresceína.

Como se muestra en la Figura 1, los niveles intracelulares de ROS se ven aumentados de manera significativa en comparación con las células control, lo que confirma que el H₂O₂, en las condiciones experimentales establecidas, es un inductor de estrés oxidativo. El pretratamiento de las células PC12 y U373-MG con los diterpenos ocasiona una inhibición de la producción de ROS intracelular, de manera significativa para andalusol, lagascatriol, linearol y sidol en los astrocitos y además para conchitriol, en las neuronas a las concentraciones de 5 y 10 μM.

A)



B)

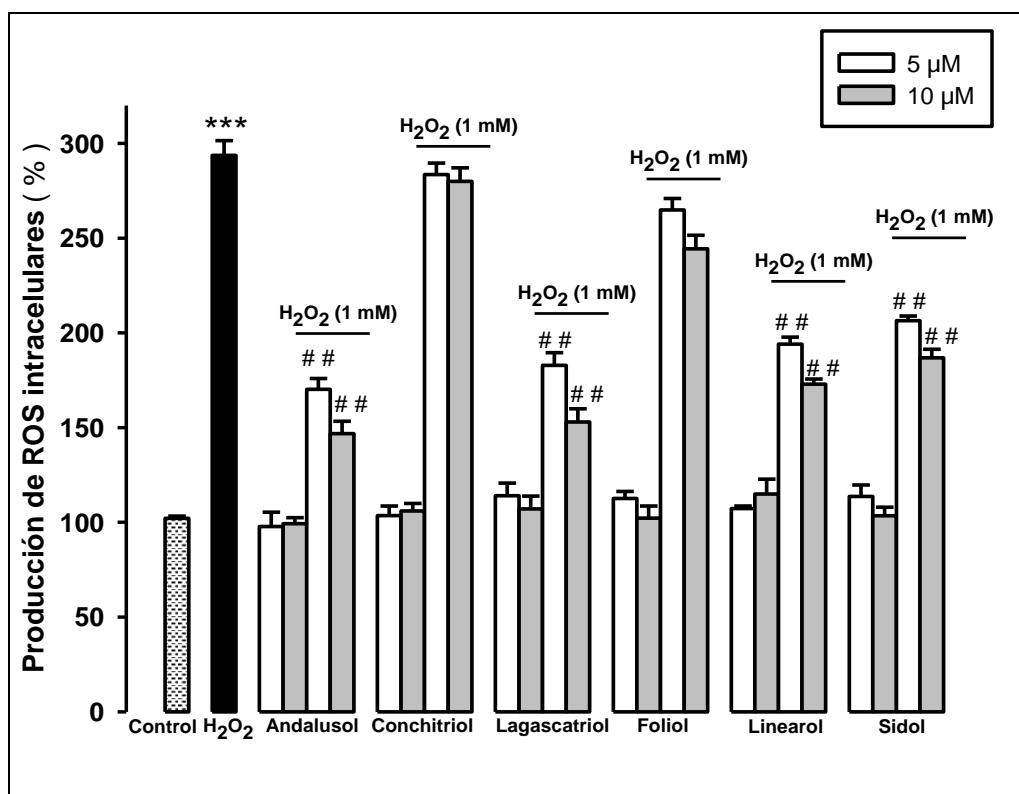
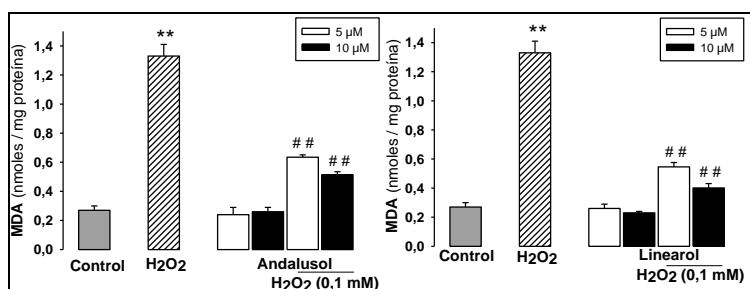


Figura 1.- Efecto sobre la producción de ROS intracelular. A) Células PC12. B) Células U373-MG. Los resultados se expresan como % de producción de ROS intracelulares respecto al control. Los resultados se expresan como media \pm Desviación Estándar (n=9) de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$ versus control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ versus H₂O₂.

Una vez demostrada la capacidad de inducción de ROS por H₂O₂, se ha evaluado el efecto protector sobre los lípidos, componentes fundamentales de las membranas y una, y quizás la primera, diana biológica de los radicales libres. El daño en la membrana se ha determinado midiendo los niveles del producto final de la peroxidación lipídica malondialdehído (MDA), ampliamente utilizado como biomarcador de estrés oxidativo en varias enfermedades neurodegenerativas (30, 31). Los resultados de este estudio (Figura 2) indican que la exposición a H₂O₂ en células PC12 y U373-MG produce una peroxidación lipídica significativa comparado con las células control. El pretratamiento celular con los diterpenos objeto de estudio, en concreto andalusol y linearol (en células PC12) y, andalusol y lagascatriol (en células U373-MG) protege frente a la peroxidación de lípidos de membrana inducida por H₂O₂, lo que por un lado confirma que estos compuestos son capaces de inhibir el daño oxidativo inducido por especies reactivas como ROS y por otro lado, se demuestra la capacidad de estos compuestos para interactuar y penetrar las bicapas lipídicas, lo que le confiere valor añadido a su actividad protectora.

A)



B)

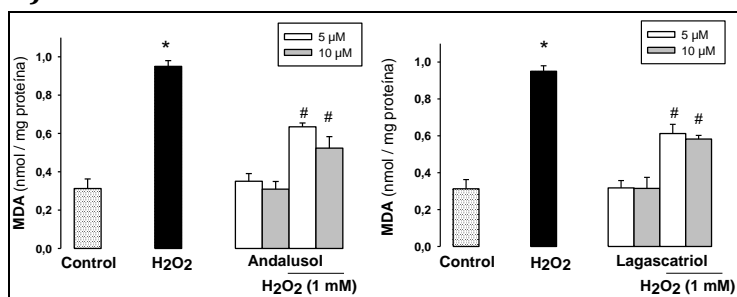


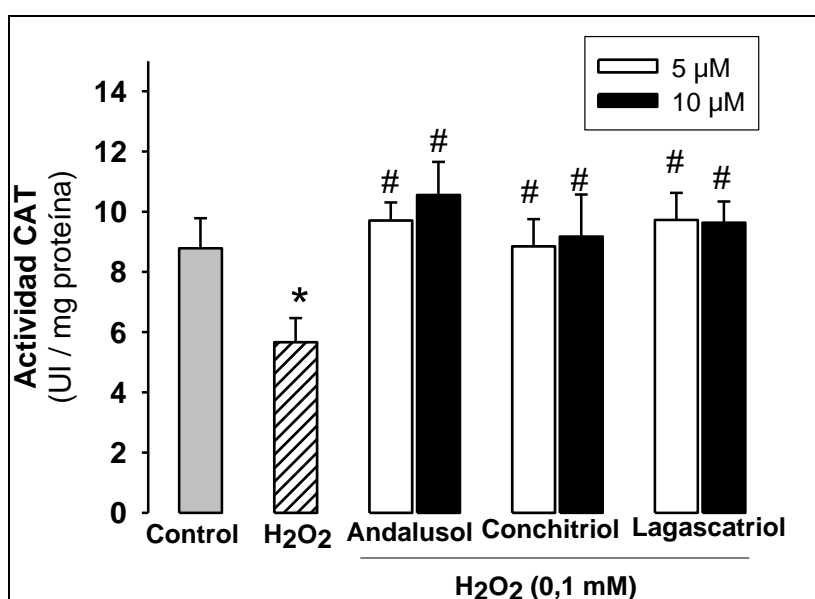
Figura 2.- Efecto sobre la peroxidación lipídica. El grado de peroxidación lipídica se cuantifica midiendo los niveles de MDA en los extractos celulares totales por HPLC. Los resultados se expresan como nmoles/mg proteína. Los resultados se expresan como media \pm Desviación Estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ versus control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ versus H₂O₂.

La activación de las enzimas antioxidantes es otro de los mecanismos que explica la acción de los compuestos antioxidantes. Cambios en los patrones enzimáticos de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutathion peroxidada (GPx), glutathion reductasa (GR) y hemoxygenasa-1 (HO-1), entre otras, se traducen en variaciones del balance redox celular, constituyendo, por tanto, un biomarcador esencial del estrés oxidativo (32, 33). Así, con objeto de profundizar en el/los mecanismos de acción de los diterpenos del presente trabajo, procedimos a estudiar el papel de estos compuestos en la actividad y expresión de las enzimas antioxidantes, mediante técnicas espectrofotométricas y de Western-blot, respectivamente. En nuestro trabajo, el tratamiento de las células con H₂O₂ produce una significativa disminución tanto en la actividad como en la expresión de las enzimas anteriormente mencionadas. El pretratamiento celular con los diterpenos de *Sideritis* produce un aumento de la actividad y de la expresión de las enzimas antioxidantes endógenas evaluadas (excepto foliol en células PC12 y conchitriol y foliol en células U373-MG), comparado con las células expuestas a H₂O₂ como único tratamiento. En la Figura 3, se muestra como ejemplo la actividad y la expresión para la enzima catalasa y los compuestos andalusol, conchitriol y lagascatriol.

Modelos *in vitro* e *in vivo* han demostrado de forma evidente una asociación entre estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. El aumento de los niveles de calcio mitocondrial puede llevar a un desacoplamiento de la función de la fosforilación oxidativa, y la consecuente disfunción mitocondrial. En la Figura 4, se muestra que ninguno de los diterpenos, a las concentraciones y tiempo de tratamiento ensayados, aumentan la concentración de calcio mitocondrial. Por otro lado, el H₂O₂ produce una significativa acumulación de calcio en la mitocondria. Cuando las células se tratan durante 24 h con los diterpenos objeto de estudio, previo a la exposición a H₂O₂, se observa una disminución en los niveles de calcio mitocondrial; concretamente, este efecto es significativamente marcado para linearol, andalusol (5 y 10 µM) y conchitriol (10 µM) en células PC12 y andalusol, lagascatriol y linearol (5 y 10 µM) y sidol (5 µM) en células U373-MG.

Una vez demostrado el potencial neuroprotector de los diterpenos en estudio, procedimos a evaluar si estos compuestos son capaces de atravesar la BHE. El estudio de permeabilidad (Tabla 1) revela que los valores de permeabilidad aparente de todos los diterpenos son menores que los del compuesto de referencia positivo, propranolol, y mayores que los del compuesto de referencia negativo, atenolol. Estudios previos han establecido que valores de permeabilidad (P_{app}) mayores de 3×10^{-6} cm/s indican que los compuestos pueden penetrar eficientemente la BHE (34). Por tanto, el valor de P_{app} de los diferentes diterpenos sugiere que éstos pueden atravesar la BHE vía transcelular por mecanismos de difusión pasiva. Andalusol y lagascatriol presentan los valores más altos de P_{app} , linearol y sidol tienen valores moderados y foliol y conchitriol, los más bajos.

A)



B)

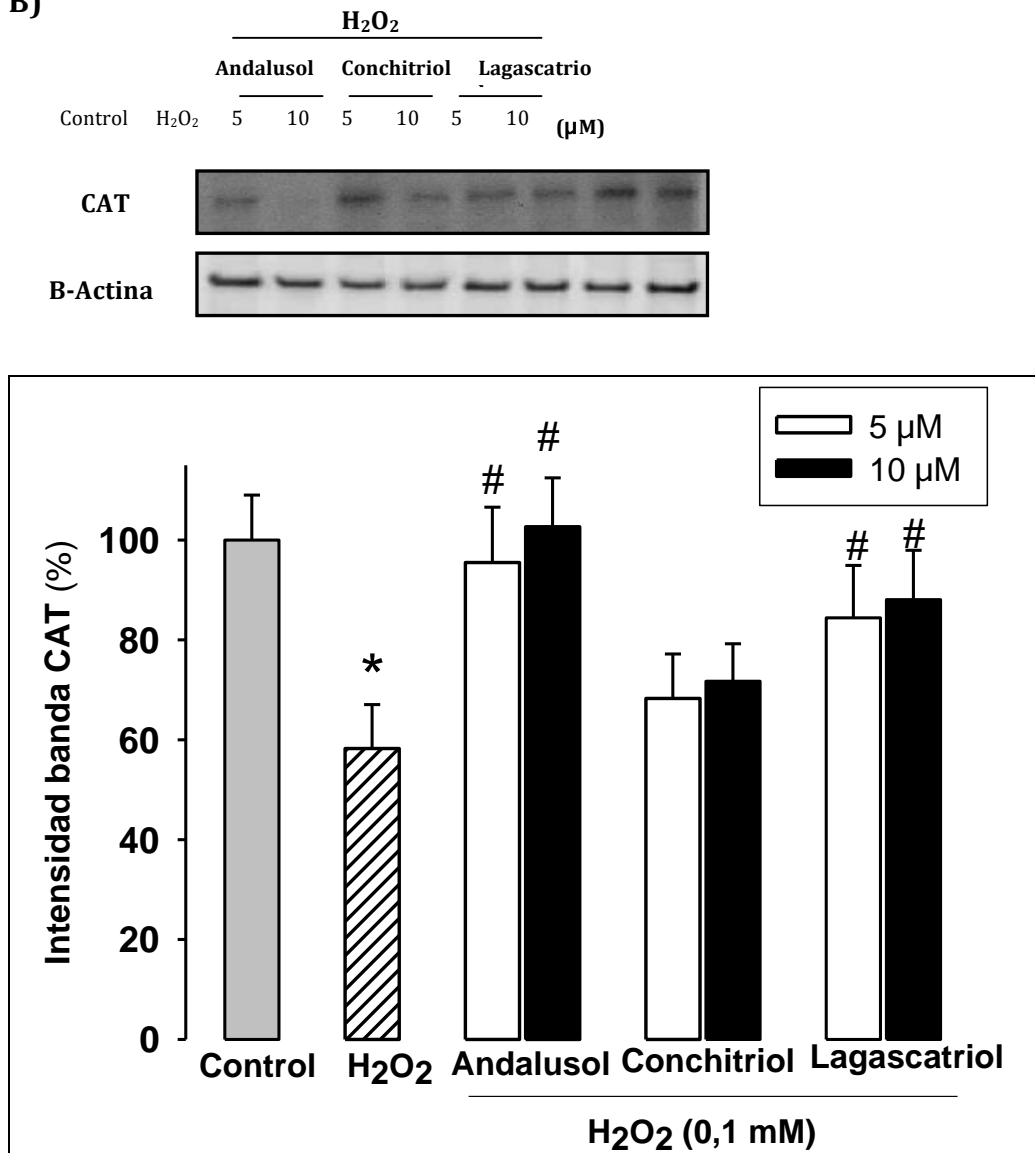


Figura 3.- Efecto en la actividad y expresión de la enzima CAT en células PC12. A) La actividad de la enzima CAT se cuantifica por métodos espectrofotométricos en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como UI/mg proteína. **B)** La expresión de proteínas se determina mediante Western blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se expresan como % de intensidad de la banda, considerándose como 100% las células control. La β-actina se utiliza como normalizador de carga. Se muestra una membrana representativa de la expresión de CAT (n=3). Los resultados se expresan como media ± Desviación Estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ versus control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ versus H₂O₂.

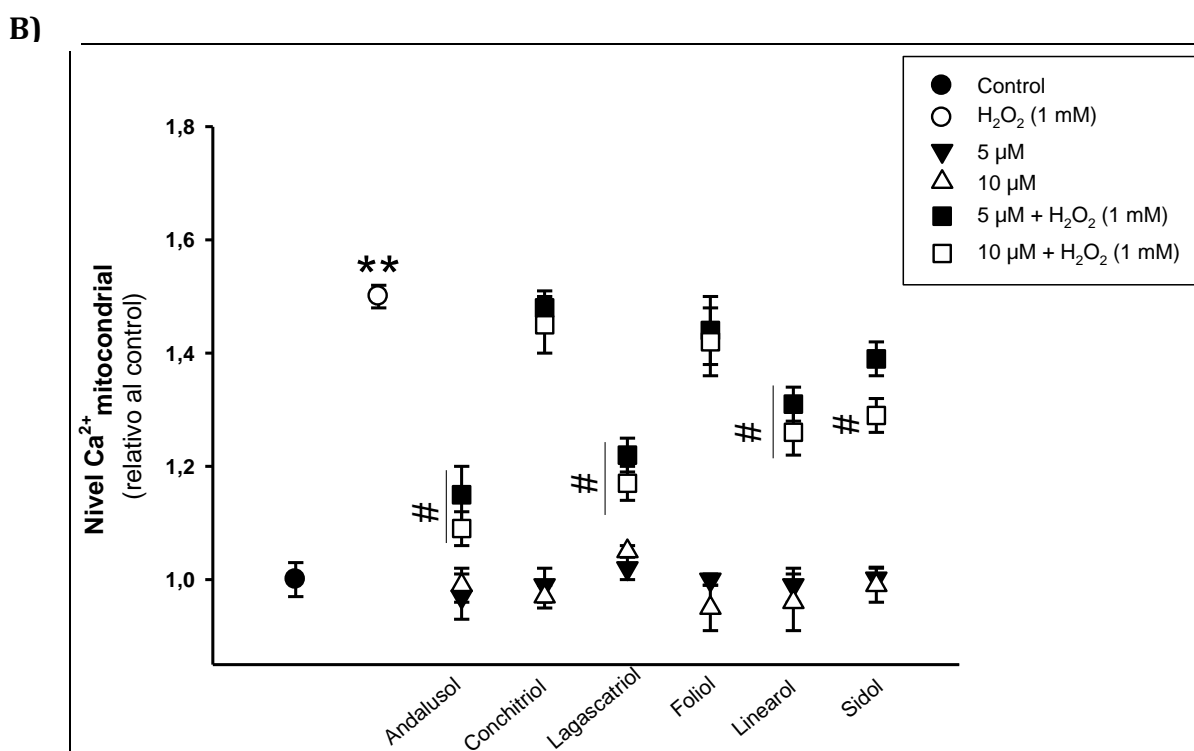
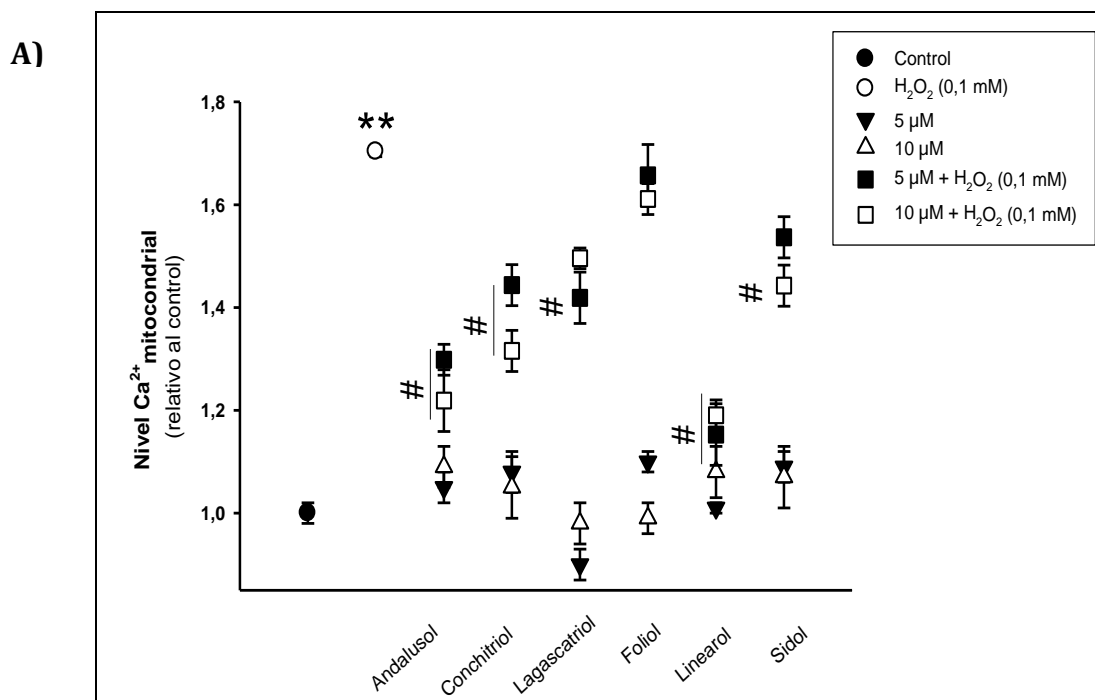


Figura 4.- Efecto sobre los niveles de calcio mitocondrial. Los cambios en los niveles de calcio mitocondrial se determinan por fluorescencia empleando el catión lipofílico fluorescente Rhod-2. Los resultados se expresan como media \pm Desviación Estándar (n=9) de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ versus control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ versus H₂O₂.

Tabla 1.- Estudios de permeabilidad. El transporte de los diferentes diterpenos se ha evaluado durante 6 horas en las direcciones absorbiva(A-B) y secretora (B-A). Los compuestos de referencia propranolol y atenolol se utilizan como control positivo y negativo, respectivamente. El ratio se determina como $P_{app}(B-A)/P_{app}(A-B)$. El porcentaje de recuperación se calcula como $100 - M_{células}$, siendo $M_{células}$ la cantidad de compuesto retenido en las membranas.) [$M_{células} = M_{D0} - (M_{Dt} + \Sigma M_R)$] (ver material y métodos 2.3.2.4.). Los datos se expresan como media \pm Desviación Estándar.

Compuesto	$P_{app}(x 10^{-6} \text{ cm/s})$		$P_{app} \text{ corregido}(x 10^{-6} \text{ cm/s})$		Ratio	Ratio corregido	% Recuperación
	A-B	B-A	A-B	B-A			
Andalusol	9,1 \pm 1,1	9,5 \pm 2,8	11,4 \pm 2,1	11,6 \pm 2,6	0,9	1,0	78,8 \pm 3,1
Conchitriol	4,6 \pm 0,9	4,8 \pm 1,4	4,8 \pm 1,1	4,9 \pm 1,6	0,9	1,0	88,1 \pm 2,2
Foliol	3,8 \pm 1,3	3,7 \pm 1,9	4,0 \pm 1,2	4,2 \pm 1,5	0,9	0,9	90,5 \pm 2,3
Lagascatriol	8,8 \pm 0,3	8,9 \pm 0,5	10,7 \pm 1,8	10,8 \pm 1,5	1,0	1,0	81,5 \pm 2,9
Linearol	6,3 \pm 0,5	6,6 \pm 1,1	8,2 \pm 1,1	8,3 \pm 0,9	0,9	1,0	83,6 \pm 3,3
Sidol	6,9 \pm 1,4	7,2 \pm 0,5	8,5 \pm 1,7	8,6 \pm 0,9	0,9	1,0	84,5 \pm 2,8
Propranolol	14,3 \pm 1,1	14,8 \pm 0,7	15,1 \pm 1,3	15,6 \pm 1,5	0,9	1,0	95,6 \pm 1,9
Atenolol	0,7 \pm 0,4	0,8 \pm 0,3	0,7 \pm 0,6	0,8 \pm 0,5	0,9	0,9	98,4 \pm 2,1

4. CONCLUSIONES

Los diterpenos estudiados ejercen un efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, inhibiendo la producción de ROS, aumentando la actividad y la expresión de enzimas antioxidantes y atenuando los cambios derivados del estrés oxidativo a nivel mitocondrial.

De forma global, al comparar la eficiencia protectora de los 6 diterpenos de *Sideritis* spp. frente al estrés oxidativo inducido por H₂O₂, se observa un patrón de actividad similar pero no idéntico para todos estos compuestos en las dos líneas celulares estudiadas. Así, en la línea celular PC12, los diterpenos andalusol y linearol han sido los más activos, seguidos de sidol, lagascatriol y conchitriol, y por último, el compuesto menos activo ha sido foliol. En los estudios realizados sobre la línea celular U373-MG, los diterpenos que han ejercido el mayor efecto citoprotector han sido andalusol y lagascatriol, seguidos de linearol y sidol, y por último, de conchitriol y foliol.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid gracias a una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

6. REFERENCIAS

1. Ehrnhoefer, D.E.; Wong, B.K.; Hayden, M.R. Convergent pathogenic pathways in Alzheimer's and Huntington's diseases: shared targets for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 853-867 (2011).
2. Katsuno, M., Tanaka, F., Sobue, G. Perspectives on molecular targeted therapies and clinical trials for neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **83**, 329-335 (2012).
3. Barnham, K.J., Masters, C.L., Bush A.I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 205-214 (2004).
4. Hayashi, M., Miyata, R., Tanuma, N. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **724**, 278-290 (2012).
5. Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* **12**, 1161-1208 (2005).
6. Avery, S.V. Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal* **434**, 201-210 (2011).
7. Floyd, R.A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **222**, 236-245 (1999).
8. Ndhlala, A.R., Moyo, M., Van Staden, J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* **15**, 6905-6930 (2010).
9. González-Burgos, E., Gómez-Serranillos, M.P. Terpene compounds in nature: A review of their potential antioxidant activity. *Current Medicinal Chemistry* **19**, 5319-5341 (2012).
10. Loğoğlu, E., Arslan, S., Öktemer, A., Şakiyan, İ. Biological activities of some natural compounds from *Sideritissipylea* Boiss. *Phytotherapy Research* **20**, 294-297 (2006).
11. González-Burgos, E., Carretero, M.E., Gómez-Serranillos, M.P. *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities- A review. *Journal of Ethnopharmacology* **135**, 209-225 (2011).
12. Piozzi, F., Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A. The diterpenoids from the genus *Sideritis*. En: Atta-ur-Rahman (Ed) *Studies in natural products chemistry* **33**, 493-540 (2006). *Bioactive Natural Products*. Elsevier.
13. Venturella, P., Bellino, A. Constituents of *Stachysitalica*. *Atti de ll'Accademia Nazionale di Scienze Arti Palermo IV* **24**, 95-99 (1965).
14. Piozzi, F., Venturella, P., Bellino, A., Mondelli, R. Diterpenes from *Sideritissicula* Ucria. *Tetrahedron* **24**, 4073-4081 (1968).
15. vonCarstenn-Lichterfelde, C., Valverde, S., Rodriguez, B. Studies on diterpenes from genus *Sideritis*. XIII two new stachene derivatives from *Sideritisangustifolia* (Labiatae). *Australian Journal of Chemistry* **27**, 517-529 (1974).
16. Martín Panizo, F., Rodríguez, B., Valverde, S. Lagascatriol, a new diterpenoid from *Sideritisangustifolia* Lag. (Labiatae). *Anales de Química* **68**, 1463-1465 (1972).
17. Martín Panizo, F., Rodríguez, B., Valverde, S. Estructura total revisada del lagascatriol, nuevo diterpeno de "*Sideritisangustifolia*" Lag. *Anales de Química* **70**, 164-171 (1974).
18. García de Quesada, T., Rodríguez, B., Valverde, S. Six new diterpenes from *Sideritisleucantha* Cav. and *Sideritislinearifolia* Lam. *Tetrahedron Letter* **22**, 2187-2190 (1972).
19. LeBel, C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology* **5**, 227-231 (1992).
20. Grotto, D., Santa Maria, L.D., Boeira, S., Valentini, J., Charão, M.F., Moro, A.M., Nascimento, P.C., Pomblum, V.J., Garcia, S.C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **43**, 619-624 (2007).
21. Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**, 121-125 (1984).
22. Marklund, S., Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* **47**, 469-474 (1974).
23. Barja de Quiroga, G., Perez-Campo, R. López-Torres, M. Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochemical Journal* **272**, 247-250 (1990).
24. Paglia, D.E., Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **70**, 158-169 (1967).

25. Deniaud, A., Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C., Brenner, C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* **27**, 285-299 (2008).
26. Gómez-Serranillos, P., Carretero, E., Slowing, K., Palomino, O. M., Villarrubia, A. I., Villar, A. HPLC Quantitative analysis of diterpenoids in *Sideritis* (Labiatae) species. *Phytotherapy Research*. **72**, S101-S103 (1998).
27. Tabner, B.J., Turnbull, S., El-Agnaf, O., Allsop, D. Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry***1**, 507-517 (2001).
28. Tabner, B.J., Turnbull, S., El-Agnaf, O.M., Allsop, D. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A(beta) and alpha-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. **32**, 1076-1083 (2002).
29. Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* **59**, 1609-1623 (1992).
30. Reed, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine* **51**, 1302-1319 (2011).
31. Hayashi, M., Miyata, R., Tanuma, N. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **724**, 278-290 (2012).
32. Wang, J.Y., Wen, L.L., Huang, Y.N., Chen, Y.T., Ku, M.C. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Current Pharmaceutical Design* **12**, 3521-3333 (2006).
33. Jazwa, A., Cuadrado, A. Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Current Drug Targets* **11**, 1517-1531 (2010).
34. Madgula, V.L., Avula, B., Yu, Y.B., Wang, Y.H., Tchantchou, F., Fisher, S., Luo, Y., Khan, I.A., Khan, S.I. Intestinal and blood-brain barrier permeability of ginkgolides and bilobalide: *in vitro* and *in vivo* approaches. *PlantaMedica***76**, 599-606 (2010).

Detección de alérgenos de cacahuete mediante un sensor de ADN

Marta Sánchez-Paniagua López¹, Gloria Frutos Cabanillas², M. Jesús Lobo Castañón³, Beatriz López-Ruiz^{1*}

¹Sec. Dptal. Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España. ²Dpto. Estadística e Investigación Operativa, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España. ³Dpto. Química Física y Analítica, Facultad de Química, Universidad de Oviedo, 33006, Oviedo, España

*e-mail: bealopru@ucm.es

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 2 (2014), pag. 377-392.

RESUMEN

En el presente trabajo se propone un genosensor electroquímico para la detección de un segmento de ADN que codifica parte de la proteína alergénica Ara h 2 del cacahuete. El genosensor se basa en un ensayo tipo sándwich, el analito hibrida con dos secuencias de bases, una de ellas inmovilizada sobre un electrodo de oro serigrafado, formando una monocapa autoensamblada. La optimización del dispositivo se realizó utilizando la metodología de Superficies de Respuesta. La máxima respuesta se encontró para concentraciones de sonda de captura y agente bloqueante, 1 μM y 2,5 mM respectivamente.

Palabras clave: cacahuete; sensor de ADN electroquímico; Superficies de respuesta.

ABSTRACT

Detection of peanut allergens by a DNA sensor

In the present work an electrochemical genosensor for detecting a DNA segment encoding part of the allergenic protein peanut Ara h 2 is proposed. Genosensors is based on a sandwich assay format, the analyte hybridized with two base sequences, one immobilized onto a screen printed gold electrode, forming a self-assembled monolayer. The optimization of the device was performed using Response Surface Methodology. The maximum response was found to be 1 μM of capture probe concentration and 2,5 mM of blocking agent concentration.

Keywords: peanut; electrochemical DNA sensor; response surface methodology.

1. INTRODUCCIÓN

La incidencia de las alergias alimentarias y la gravedad de sus consecuencias han incrementado el interés de los consumidores y ha pasado a ser una cuestión de seguridad alimentaria y salud pública. Se estima que en Europa las alergias alimentarias afectan aproximadamente al 1-2 % de la población adulta y al 5-7 % de la población infantil, aumentando su incidencia en los últimos años. Se hace indispensable tomar medidas para proteger a la población sensible, informando adecuadamente sobre los ingredientes alergénicos que contienen los alimentos e identificando posibles contaminaciones cruzadas. Por ello, se han establecido normas de etiquetado que obligan a indicar su presencia. La legislación alimentaria española, en sentido estricto, no regula los alérgenos, lo que hace es fijar obligaciones en cuanto a la información en el etiquetado sobre estos ingredientes alérgenos. Existe una lista de 14 grupos de ingredientes alergénicos, entre los que se encuentra el cacahuete y los productos a base de cacahuetes, que es obligado declarar en el etiquetado de los productos alimenticios con independencia del porcentaje en peso que representen en el producto final. Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios en España y Reglamento N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. Entre esos 14 grupos se encuentra el cacahuete y productos a base de cacahuetes. El cacahuete *Arachis hypogaea*, conocido también como maní y perteneciente a la familia de las Papilionáceas (leguminosas), es un alimento muy alergénico de gran importancia sanitaria por la incidencia y severidad de la reacción alérgica que produce. En los países desarrollados afecta a un 0,4%-0,6% de los niños y un 0,3%-0,7% de los adultos. En España, la prevalencia de esta alergia está aumentando, probablemente debido a la mayor popularidad de los productos derivados del cacahuete y a su inclusión en las dietas infantiles.

Algunas de las proteínas de almacenamiento del cacahuete son las responsables de la reacción alérgica. Aproximadamente, el 20% del contenido total proteico del cacahuete se puede atribuir al alérgeno principal Ara h 1 y el 10% al alérgeno Ara h 2. Estos dos alérgenos son la causa del 95% de las reacciones alérgicas de esta legumbre (1). La sensibilización al cacahuete ocurre generalmente durante la infancia y con frecuencia persiste a lo largo de la vida; en este sentido, difiere de otras alergias alimentarias frecuentes (como la alergia a las proteínas de la leche o del huevo), que surgen en la infancia pero generalmente desaparecen en la vida adulta.

Aunque no se conoce con certeza el nivel umbral necesario para causar la reacción alérgica, hay estudios que demuestran que cantidades de proteína del orden de microgramos son suficientes para originar reacciones objetivas en sujetos hipersensibles (2). Por lo tanto, la presencia, no declarada, de trazas de cacahuete en los alimentos puede ser muy peligrosa para estos individuos. Bock y col. realizaron un estudio de 32 casos de muerte por anafilaxia debidas a la ingestión de alimentos alergénicos. Encontraron que más de la mitad de los accidentes mortales (55-67%) se debieron a la ingestión de cacahuete y que en el 90% de los casos, los alérgenos responsables fueron los cacahuetes y las nueces (3). Además de los numerosos productos alimenticios industriales que incluyen cacahuetes como galletas, chocolate, aperitivos, cereales, es habitual encontrarse con alimentos que contienen este alérgeno cuyo origen es la contaminación cruzada producida durante el procesamiento. Por ello, resulta necesario disponer de métodos adecuados de análisis para la detección de alérgenos de cacahuete en productos alimenticios. Se han desarrollado múltiples métodos analíticos basados en la detección de dos tipos de macromoléculas, proteínas y ADN: los primeros detectan alguna de las proteínas alergénicas del cacahuete, mientras que los segundos se basan en la detección de secuencias de oligonucleótidos que codifican alguna de dichas proteínas alergénicas. Los métodos más utilizados para la detección de proteínas son los ensayos de inmunoenzimología y, en especial, el método ELISA (4-6). Aunque este ensayo ha demostrado ser sensible y versátil, consume tiempo y es relativamente caro, además, los procesos de producción implican un tratamiento térmico que, a menudo, desnaturaliza las proteínas de los alimentos, alterando de este modo su estructura terciaria e impidiendo su detección. Teniendo en cuenta que el ADN no se altera tras someterse a altas temperaturas, los métodos basados en la detección de ADN surgen como una interesante alternativa. Dentro de estos métodos, el primero en aparecer y más utilizado hasta el momento es la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, cuantitativa (7-9), método muy sensible que requiere equipos caros y personal cualificado. Estos inconvenientes han impulsado el desarrollo de otros métodos analíticos entre los que se encuentran los biosensores de ADN o genosensores, que presentan ventajas como su menor coste, facilidad de manejo, posibilidad de automatización, etc. En la revisión bibliográfica realizada solo se ha encontrado un genosensor electroquímico aplicado a la detección de alérgenos de cacahuete, basado en la detección del ADN que codifica parte del alérgeno Ara h 1 (10).

En el presente trabajo se propone un genosensor electroquímico para la detección del ADN que codifica parte de la proteína alergénica Ara h 2. Se optó por un formato tipo sándwich en el que todo el analito hidriza con dos secuencias complementarias, una inmovilizada sobre un electrodo de oro serigrafado y la segunda funcionalizada con biotina. La optimización del dispositivo se llevó a cabo mediante diseños de experimentos (DoE), metodología que ha demostrado ser una

potente herramienta en química analítica y, especialmente, en la optimización de dispositivos analíticos, aunque su uso no está muy extendido en el campo de los biosensores (11-13).

La metodología de diseños de experimentos es una herramienta matemática y estadística cuyos objetivos son seleccionar la estrategia experimental óptima que permita obtener la máxima información con el mínimo coste y evaluar los resultados experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad. Los DoE ofrecen ventajas incuestionables frente a la metodología clásica, entre las que cabe destacar: *i*) estima el error experimental, *ii*) calcula la influencia simultánea de los factores, *iii*) calcula el efecto de las interacciones, *iv*) con el mismo número de experimentos proporciona mayor información, y *v*) supone un ahorro de tiempo y esfuerzo así como un menor coste económico (14).

Existen gran variedad de diseños de experimentos (15). Una forma de clasificarlos es en función del objetivo analítico propuesto, diferenciándose entre *diseños de cribado o "screening"* y *diseños de optimización*. En los diseños *screening* el objetivo es reducir el posible número de factores experimentales que afectan a la respuesta, descartando los que tienen menor o ninguna influencia en la misma. Estos diseños son adecuados en la fase inicial de experimentación y entre los más utilizados se encuentran los Diseños Plackett-Burman y Diseños Factoriales a dos niveles. Existen dos tipos de diseños factoriales, completos y fraccionados. En los diseños factoriales completos se utilizan todas las combinaciones posibles de todos los factores a todos los niveles implicados en el experimento, habrá L^k combinaciones de L niveles de k factores. Los diseños factoriales fraccionados están formados por una fracción del correspondiente diseño factorial completo y contemplan un número menor de experimentos. Una vez realizado el cribado de las variables, se procede a la optimización de la respuesta, para lo cual se utilizan diseños factoriales a tres o más niveles, Diseños Centrales compuestos, Diseños Box-Behnken, Diseños Doehlert y Diseños D-óptimos entre otros, que aportan información relacionada con el efecto cuantitativo de los factores así como sus interacciones y permiten obtener la Superficie de Respuesta para la variable dependiente en el espacio de las variables independientes.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

El 6-mercapto-1-hexanol (MCH), ditioneitol (DTT), fosfatasa alcalina-estreptavidina (ALP-Strp), 1-naftilfosfato, albúmina humana (BSA), tween 20, las sales para la preparación de las disoluciones tampón (Tris, KCl, MgCl₂) y la disolución 20× de fosfato de sodio salino con EDTA pH 7.4 (200 mM fosfato sódico, 3 M NaCl, 20 mM EDTA) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (España) y

utilizados sin purificación previa. El etanol y el ácido sulfúrico fueron adquiridos en Panreac (España).

Las disoluciones tampón utilizadas en la preparación del sensor fueron: *i*) disolución tampón de inmovilización e hibridación formada por 2×SSPE pH 7,4; *ii*) disolución tampón de bloqueo consistente en 5×SSPE pH 7,4 + 5% BSA + 0,1% Tween 20; y *iii*) disolución tampón de medida compuesta por 0,5 M Tris-HCl pH 9,8 + 1 mM de MgCl₂ + 0,1 M de KCl.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas fueron suministradas por Sigma-Life Science (Reino Unido). Dichas disoluciones se reconstituyeron en agua Milli-Q y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.2. Instrumentación

Las medidas electroquímicas se realizaron en un potenciostato Autolab PGSTAT 12, controlado por el software GPES 4.9005 (EcoChemie B.V, Holanda). Se utilizaron electrodos serigrafiados de oro (referencia 220BT; DropSens, España) que constan de una configuración de tres electrodos impresos en una lámina de alúmina, un electrodo de trabajo (diámetro 4 mm) y un electrodo auxiliar, ambos de oro, y un electrodo de pseudo-referencia de plata. La celda electroquímica está limitada por un anillo formado por un polímero aislante que rodea a los tres electrodos y tiene un volumen máximo de 50 µL. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizándose un electrodo para cada medida. Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro Crison micropH 2001 (España). Para la cuantificación del ADN se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Cary 300 Bio (Agilent Technologies, Estados Unidos).

2.3. Procedimiento experimental

2.3.1. Diseño del sensor de ADN

Como todos los biosensores, los genosensores o sensores de ADN combinan un elemento de reconocimiento biológico, que en este caso es una secuencia de oligonucleótidos denominada sonda, con un transductor encargado de la medida de la reacción de hibridación entre la sonda y el analito. La sonda utilizada será complementaria a la secuencia de ADN de interés (analito) y formarán un híbrido de Watson-Crick con extrema selectividad incluso en presencia de sondas de oligonucleótidos no complementarias.

La preparación del sensor comienza por la formación de una monocapa autoensamblada (SAM) sobre la superficie del electrodo de oro. Antes de su utilización, los electrodos serigrafiados de oro se sometieron a un proceso de limpieza que consistió en lavado con etanol y agua Milli-Q seguido de un pretratamiento electroquímico de 25 barridos cíclicos entre 0 y +1,6V, a 100 mV/s, en H₂SO₄ 0,1 M, para eliminar los residuos del proceso de fabricación, y así mejorar la sensibilidad y reproducibilidad de los resultados (16).

La monocapa mixta (SAM), consta de una sonda de ADN tiolada y como agente bloqueante, mercaptohexanol (MCH). La inmovilización de la sonda se llevó a cabo mediante un proceso de quimisorción, unión colavente entre los grupos SH de la sonda con el Au del electrodo. El MCH se intercala entre las hebras de ADN quimisorbidas, controlando su disposición sobre el electrodo e impidiendo las adsorciones inespecíficas de la sonda. Las cadenas de ADN se orientan paralelas entre sí y perpendiculares a la superficie eléctrica (Figura 1), y así, favorecen el proceso de hibridación (17, 18).

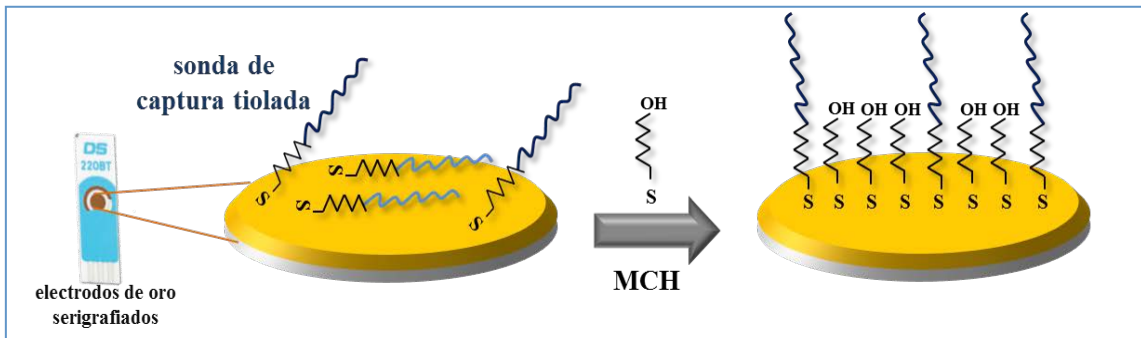


Figura 1.- Formación de una monocapa autoensamblada mixta organizada sobre electrodos de oro serigrafiado.

Para la inmovilización de la sonda de captura se depositaron 15 μL de una disolución de la sonda en el tampón de inmovilización, manteniéndose en atmósfera cerrada y saturada con agua durante 19 horas. La monocapa mixta se completó adicionando 10 μL de MCH en disolución tampón de inmovilización; dejándose 15 min. Las concentraciones de sonda de captura y MCH cambian y se especifican en cada una de las experiencias.

El genosensor propuesto se basa en un formato tipo sándwich que requiere la hibridación completa del analito con dos sondas diferentes. Una parte de la secuencia del analito hibrida con una sonda indicadora biotinilada (hibridación homogénea, Figura 2.A) y el resto de analito hibrida con la sonda de captura inmovilizada (hibridación heterogénea, Figura 2.B). La hibridación homogénea se llevó a cabo mezclando el analito y la sonda indicadora en la disolución tampón de hibridación, con una concentración de sonda indicadora final de 2 μM . La mezcla se calentó a 98 $^{\circ}\text{C}$ para romper las estructuras secundarias de ambas sondas, se sumergió en hielo y se dejó reposar a temperatura ambiente para favorecer la hibridación. Posteriormente, se depositaron 15 μL de esta disolución sobre el electrodo modificado, dejando que transcurriese la hibridación heterogénea durante 2 horas a temperatura ambiente.

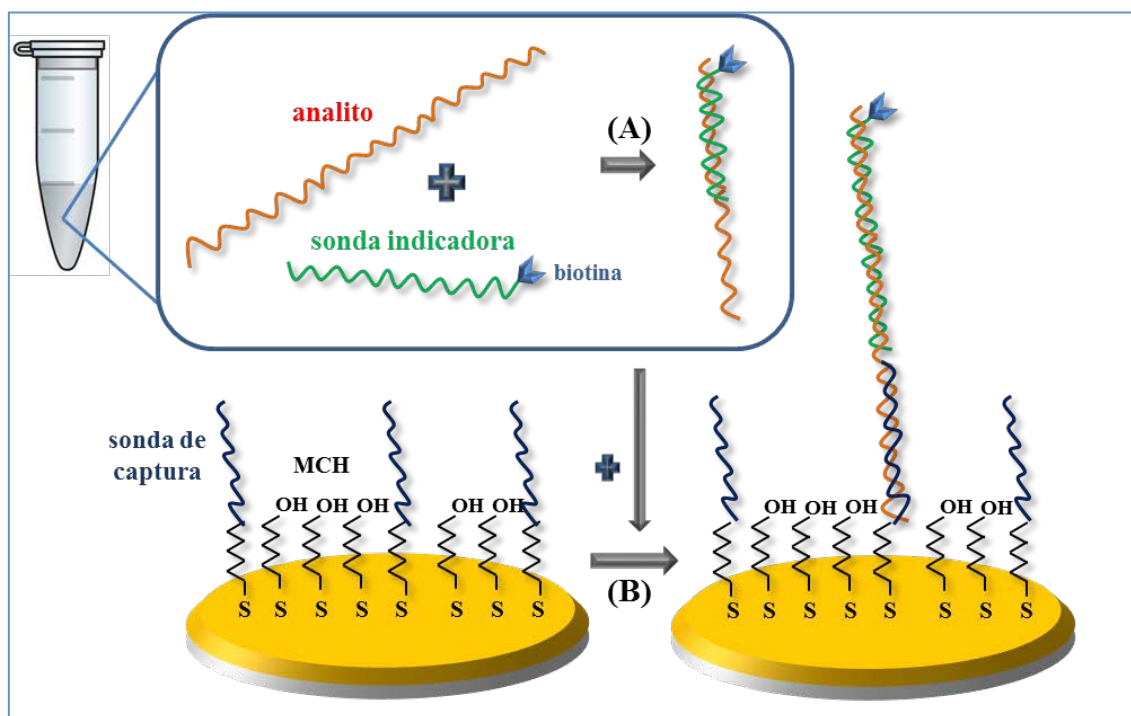


Figura 2.- Etapa de hibridación. (A) Hibridación homogénea o en disolución e (B) hibridación heterogénea o en superficie

Concluida la etapa de hibridación, se procedió al marcaje enzimático, añadiendo 15 μL de una disolución del conjugado fosfatasa alcalina-estreptavidina ($1,075 \cdot 10^{-3}$ g/L) sobre la monocapa. La sonda indicadora biotilada se unió al conjugado enzimático por el enlace de alta afinidad estreptavidina-biotina. Finalmente, se llevó a cabo la detección electroquímica para lo cual se añadió, a la superficie electródica, 40 μL de una disolución de 1-naftilfosfato 4 mM en disolución tampón de medida. El enzima ALP cataliza la conversión de 1-naftilfosfato a 1-naftol, producto electroactivo de estructura plana heterocíclica, cuya oxidación se midió mediante voltamperometría de pulso diferencial (DPV), realizando un barrido de 0 a +0,6 V.

2.3.2. Diseño de experimentos

Se realizó un diseño factorial completo 3^2 , con 2 variables (concentraciones de sonda de captura y MCH) medidas a 3 niveles. Los resultados se analizaron con el software estadístico Statgraphics® Centurion, versión XVI (19). El modelo que puede soportar el diseño utilizado es la función polinómica de segundo grado:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

donde los coeficientes β representan los efectos lineales y cuadráticos de las variables X_1 (concentración de sonda de captura, M) y X_2 (concentración de MCH, M) así como su interacción. La variable dependiente o variable respuesta es la respuesta electroquímica medida por el genosensor (intensidad de corriente, A).

En general, los diseños de experimentos se escriben en términos de variables codificadas. En un diseño a tres niveles, como es este caso, los niveles de los factores codificados son +1, 0 y -1, donde +1 es el valor máximo considerado, -1 el valor mínimo y 0 el valor central. En la Tabla 1 se muestra la matriz codificada y la matriz experimental y los niveles experimentales fijados para cada uno de los factores estudiados.

Tabla 1. - Matriz codificada y matriz experimental del Diseño Factorial 3²

Matriz codificada		Matriz experimental	
Niveles del factor 1	Niveles del factor 2	Concentración de la sonda de captura (μM)	Concentración de MCH (mM)
0	-1	1,05	0,5
0	0	1,05	2,5
+1	+1	2	4,5
0	0	1,05	2,5
0	+1	1,05	4,5
-1	+1	0,1	4,5
-1	-1	0,1	0,5
+1	-1	2	0,5
0	0	1,05	2,5
0	0	1,05	2,5

El diseño propuesto se realizó, en el mismo instrumento, el mismo día y por el mismo operador, es decir, en condiciones de repetibilidad. La aleatoriedad en el orden de realización de los experimentos asegura, en la medida de lo posible, que factores incontrolados no afecten de forma sistemática a los resultados obtenidos y se asegura que las estimaciones de la varianza en la repetibilidad reflejen de manera adecuada los aspectos aleatorios del proceso.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Selección de las sondas de oligonucleótidos

Para obtener un sensor útil desde el punto de vista analítico, el fragmento de oligonucleótidos elegido como analito tiene que cumplir como mínimo las siguientes características: *i*) ser específico del cacahuete y *ii*) no tratarse de una secuencia de ADN muy larga (no más de 100 nucleótidos) para evitar la aparición de estructuras secundarias y apareamientos de bases que dificultarían la hibridación (20).

Como analito se seleccionó una secuencia de 86-mer que codifica parte de la proteína Ara h 2, característica del cacahuete y cuya especificidad se comprobó mediante el programa BLAST (21).

Se seleccionó una sonda de captura de 32 bases tiolada en el extremo 5', complementaria en su totalidad con parte del analito y una sonda indicadora de 54 nucleótidos funcionalizada en su extremo 3' con biotina. La sonda de captura se diseñó de forma que hibride con la parte del analito que queda libre en la hibridación con la sonda indicadora, formando las tres hebras un dúplex perfecto. De esta forma, se evita que alguna base quede sin hibridar y dé lugar a adsorciones inespecíficas sobre el electrodo y por tanto a errores en la medida.

Para predecir las posibles estructuras secundarias de las sondas y la energía de hibridación del analito con la sonda de captura e indicadora se utilizó el programa informático Mfold web Server (22). La estructura secundaria de la sonda de captura presenta una energía libre $\Delta G = -2,9$ kcal/mol, la del analito $\Delta G = -16,71$ kcal/mol, la de la sonda indicadora $\Delta G = -4,39$ kcal/mol, el híbrido analito-sonda de captura presenta una energía libre $\Delta G = -49,8$ kcal/mol y el híbrido analito-sonda indicadora $\Delta G = -85,5$ kcal/mol. Estos datos demuestran la hibridación espontánea del analito con las dos sondas.

3.2. Selección de las características del diseño de experimentos

En la ejecución de un diseño de experimentos resulta de gran importancia identificar adecuadamente los factores o variables independientes que pueden afectar a la respuesta (variable dependiente) así como sus niveles experimentales. Una selección errónea de estos niveles podría dar lugar a respuestas muy similares que no se deberían a la no influencia del factor sobre la respuesta sino simplemente a que el factor no afecta en la zona de trabajo, pero puede hacerlo si se amplía dicha zona.

Se comenzó por optimizar la composición de la monocapa, considerando como factores las concentraciones de sonda de captura y de mercaptohexanol. Al seleccionar los niveles, hay que intentar conseguir una SAM homogénea y no demasiado compacta de forma que se permita el contacto entre las hebras complementarias (23).

Experiencias previas demostraron que una concentración de sonda de captura inferior a $0,1 \mu\text{M}$ producía defectos en la monocapa quedando zonas de oro no cubiertas. Por otra parte, se requiere un exceso de sonda de captura en relación al híbrido analito-sonda indicadora con el fin de asegurar que todo el analito incorporado va a poder reaccionar con la sonda de captura para formar el híbrido final. Teniendo esto en cuenta se consideraron como límites experimentales $0,1$ y $2 \mu\text{M}$.

Estudios previos aportan evidencias de que aunque el tratamiento posterior con MCH no permite eliminar completamente el ADN adsorbido inespecíficamente, se logra una disminución considerable de las interacciones inespecíficas y una eficiencia de hibridación superior a la de una SAM pura de ácido nucleico tiolado (24). Con el objetivo de minimizar las absorciones inespecíficas de la sonda de captura sobre la superficie electródica, en todos los casos se añadió mayor cantidad de MCH que de sonda de captura. Valores de MCH inferiores a 0,5 mM producían descensos drásticos en la señal voltamperométrica del 1-naftol, generándose probablemente una monocapa irregular. Se comprobó que concentraciones superiores a 4,5 mM provocaban el desplazamiento de la sonda de captura. Como consecuencia se seleccionaron como valores límites 0,5 y 4,5 mM.

3.3. Ensayo preliminar

Antes de realizar los diseños de experimentos se llevó a cabo un estudio previo con el fin de comprobar que las sondas de captura e indicadora hibridan, de forma selectiva, con el analito y que ese evento de hibridación se traduce en una señal electroquímica. Se optó por valores de concentración de sonda de captura y MCH utilizados con éxito en trabajos anteriores (16), 2 μ M y 4,5 mM respectivamente. El resto de condiciones experimentales fueron las descritas en el Procedimiento Experimental. En la Figura 3 se muestra el voltamperograma obtenido con el analito y con una secuencia no complementaria (nC), ambas a un nivel de concentración 1 nM. El analito dio una señal muy superior al blanco mientras que la señal generada por la sonda no complementaria fue semejante a la generada por el blanco, lo que demuestra la complementariedad de las sondas con el analito y la especificidad del dispositivo.

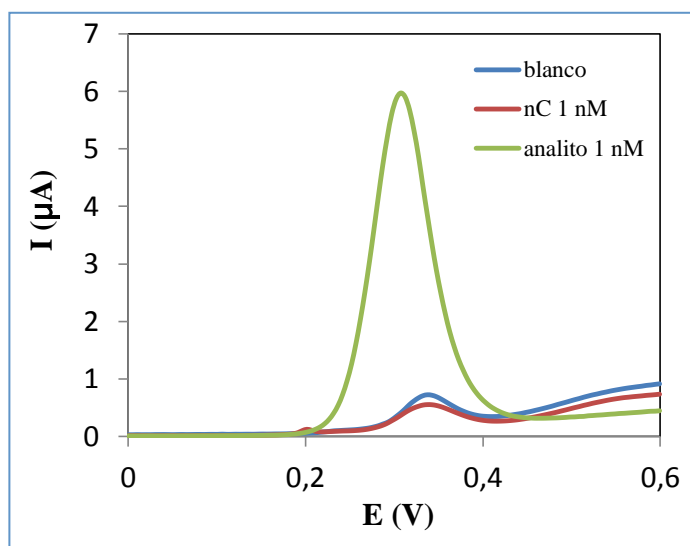


Figura 3.- Voltamperogramas obtenidos con la secuencia analito, una secuencia no complementaria y un blanco. Condiciones experimentales: Voltametría diferencial de impulsos, amplitud de pulso 20 mV, velocidad de barrido 10 mV/s.

3.4. Optimización de la monocapa

Con el objetivo de optimizar la composición de la monocapa se realizaron dos diseños factoriales completos 3^2 , ya descritos en el apartado Diseño estadístico, siendo las variables independientes las concentraciones de sonda de captura y de MCH. En el primero de ellos se utilizó una concentración de analito de 10 nM. El diagrama de Pareto (Figura 4.A) muestra la influencia de las variables y sus interacciones en la respuesta del sensor, siendo el efecto cuadrático de ambas variables el de mayor influencia en la respuesta. El efecto individual de las variables muestra una influencia menor, siendo positivo el efecto del MCH y negativo el efecto de la sonda de captura. El modelo matemático obtenido corresponde a la función

$$S_{\text{analito}} \text{ (A)} = 5,22737 \times 10^{-6} + 4,98504 \times 10^{-6} [\text{sonda captura}] + 5,97693 \times 10^{-6} [\text{MCH}] - 4,50416 \times 10^{-6} [\text{sonda captura}]^2 + 1,54737 \times 10^{-6} [\text{sonda captura}][\text{MCH}] - 1,4 \times 10^{-6} [\text{MCH}]^2$$

La Figura 4.B muestra los efectos principales sobre la intensidad de corriente producidos por las dos variables. En la Figura 4.C se muestra la superficie de respuesta y en la Figura 4.D las correspondientes curvas de nivel proyectadas en el plano formado por los dos factores. Estas curvas de nivel muestran las condiciones experimentales para las que se obtiene el valor máximo de respuesta así como un espacio próximo al óptimo con la misma respuesta para distintas condiciones experimentales, pudiendo elegir de toda la zona los valores de los factores más convenientes según otros criterios económicos de tipo coste, tiempo, etc. Este máximo viene definido por los valores óptimos de los factores implicados que resultaron ser $1 \mu\text{M}$ de sonda de captura y $2,5 \text{ mM}$ de MCH.

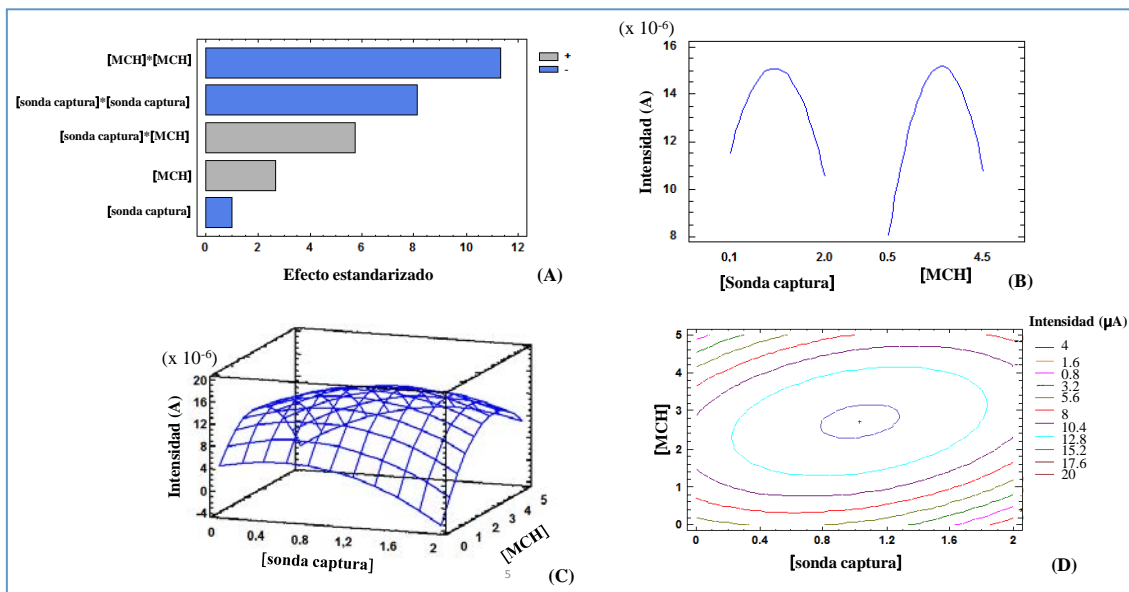


Figura 4.- Resultados del diseño factorial 3^2 con analito 10 nM, (A) diagrama de Pareto estandarizado para intensidad de corriente, (B) gráfica de efectos principales para la intensidad, (C) superficie de respuesta y (D) curvas de nivel.

Debido a la complejidad de la monocapa es habitual la aparición de adsorciones inespecíficas de las sondas y los agentes que la componen y que se traduce en señales indeseables. Para averiguar la posible existencia de estas adsorciones y su efecto en la señal, se realizó un segundo diseño con una disolución blanco. La matriz experimental y los niveles de los factores del diseño factorial 3^2 fueron los mismos que en el diseño anterior. Según el diagrama de Pareto (Figura 5.A), el MCH fue el factor de mayor influencia, siendo ésta negativa al igual que la sonda de captura, es decir, el blanco dio menor señal al aumentar el contenido de sonda y agente bloqueante. Este hecho se atribuye a la formación, bajo estas condiciones, de una monocapa compacta y sin huecos que dificultan las adsorciones inespecíficas. El modelo matemático ajustado corresponde a la función

$$S_{\text{blanco}} (A) = 8,43393 \times 10^{-7} - 1,48473 \times 10^{-7} [\text{sonda captura}] - 2,19162 \times 10^{-7} [\text{MCH}] - 1,19114 \times 10^{-8} [\text{sonda captura}]^2 + 3,32895 \times 10^{-8} [\text{sonda captura}][\text{MCH}] + 2,3625 \times 10^{-8} [\text{MCH}]^2$$

La Figura 5.B muestra los efectos principales sobre la intensidad de corriente producidos por las dos variables, no estableciéndose un valor mínimo de respuesta para la sonda de captura en la zona de experimentación. Así mismo, la superficie de respuesta (Figura 5.C) no presenta un óptimo y las curvas de nivel de este ensayo (Figura 5.D) muestran una tendencia que apunta hacia la posibilidad de modificar el campo experimental hacia valores mayores de sonda de captura, sin embargo, mayores concentraciones de sonda de captura dificultarían la reacción de hibridación por impedimento estérico.

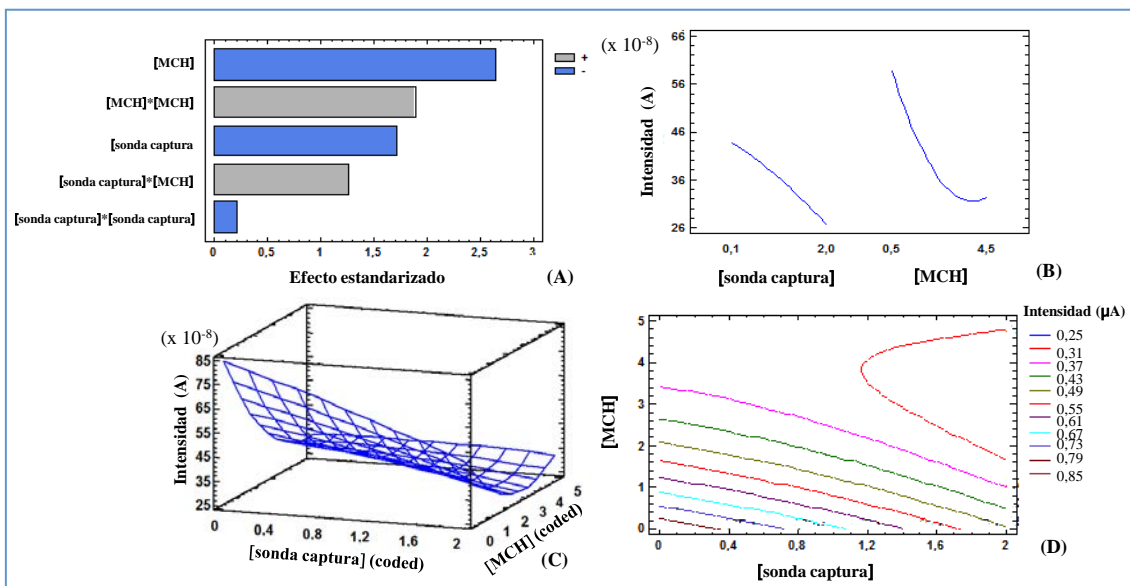


Figura 5.- Resultados del diseño factorial 3^2 con un blanco (A) diagrama de Pareto estandarizado para intensidad de corriente, (B) gráfica de efectos principales para la intensidad, (C) superficie de respuesta y (D) curvas de nivel.

Con el objetivo de conocer la señal debida exclusivamente al analito, se generó una nueva variable *diferencia* (señal del analito – señal del blanco). El modelo matemático obtenido corresponde a la ecuación

$$S_{\text{analito}} - S_{\text{blanco}} \text{ (A)} = 4,39816 \times 10^{-6} + 5,13019 \times 10^{-6} [\text{sonda captura}] + 6,17592 \times 10^{-6} [\text{MCH}] - 4,49307 \times 10^{-6} [\text{sonda captura}]^2 + 1,51579 \times 10^{-6} [\text{sonda captura}][\text{MCH}] - 1,42 \times 10^{-6} [\text{MCH}]^2$$

En la Figura 6 se muestran la superficie de respuesta para el analito, el blanco y la *diferencia* y la curva de nivel para la diferencia en la Figura 6.D. Los valores óptimos prácticamente coincidieron con los obtenidos previamente, 1µM de sonda de captura y 2,5 mM de MCH, ya que la señal obtenida por el blanco, en estas condiciones, es prácticamente despreciable frente a la obtenida con el analito. Reducir los valores del blanco es uno de los principales objetivos en estos dispositivos analíticos, para así aumentar la relación señal/blanco y, como consiguiente, el límite de detección. Los blancos obtenidos en estas condiciones experimentales hacen que la relación S/B aumente de manera apreciable.

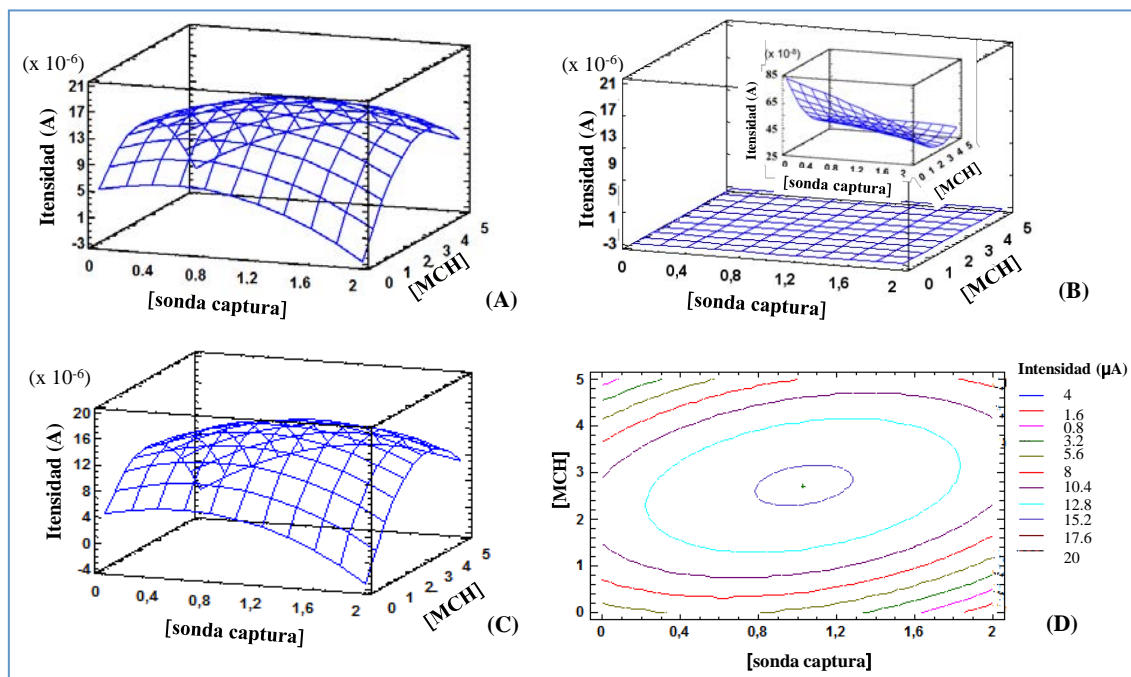


Figura 6.- Curvas de superficie de respuesta: (A) 10 nM de analito, (B) blanco y (C) diferencia 10 nM analito-blanco. (D) Curva de nivel para la variable *diferencia*.

3.5. Curva de calibrado y estudio de reproducibilidad

Se realizó una curva de calibrado, bajo las condiciones experimentales óptimas obtenidas de los diseños de experimentos, 1µM de sonda de captura y 2,5 mM de MCH. Se observó una relación lineal entre la intensidad de corriente y la concentración de analito, con un intervalo lineal de $1 \cdot 10^{-10}$ a $1 \cdot 10^{-7}$ M (Figura7), una ecuación $I \text{ (A)} = 2 \cdot 10^{-6} C \text{ (nM)} + 4 \cdot 10^{-6}$, y un coeficiente de regresión: $r=0,998$. El límite de detección resultó ser 50 pM. Para la reproducibilidad se midió la respuesta de una disolución de analito 10 nM en ocho electrodos diferentes, el coeficiente de variación obtenido fue 7,56 % ($n = 8$).

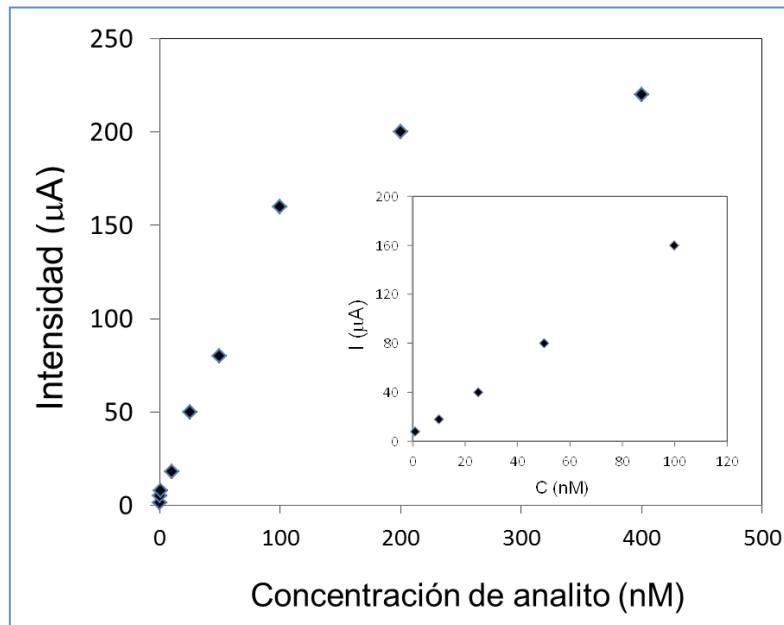


Figura 7.- Curva de calibrado obtenida bajo las condiciones óptimas: $1\mu\text{M}$ de sonda de captura, $2,5\text{ mM}$ de MCH, $2\mu\text{M}$ de sonda de indicadora, $1,075\cdot 10^{-3}\text{ g/L}$ conjugado ALP-Strp y 4 mM naftilfosfato. Inlet: Intervalo lineal.

4. CONCLUSIONES

Las sondas indicadora y de captura seleccionadas hibridan de manera selectiva con el analito, y el sensor de ADN electroquímico resultante permitió la determinación selectiva de una secuencia específica de Ara h 2, proteína alergénica del cacahuete. Mediante el uso de diseños experimentales factoriales 3^2 se obtuvieron superficies de respuesta a partir de las cuales se calcularon los valores óptimos de los factores considerados en la optimización de la monocapa autoensamblada, $1\mu\text{M}$ de sonda de captura y $2,5\text{ mM}$ de mercaptohexanol. El genosensor propuesto presenta una relación lineal entre la respuesta analítica y la concentración de analito en un amplio intervalo concentraciones, entre $0,1\text{ nM}$ y $0,1\mu\text{M}$, con un límite de detección del orden de picomolar y una reproducibilidad satisfactoria, que lo hace idóneo para su utilización como detector del alérgeno Ara h 2.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero obtenido a través del Proyecto Nacional financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad. Código: MINECO-13-CTQ2012-31157 y del Grupo de Investigación Universidad Complutense (Ref. Grupo: 950247).

6. REFERENCIAS

1. Hefle, S. Methods for detecting peanuts in food. Detecting allergens in food; Koppelman, S.J., Hefle, S.L. Ed.; Woodhead Publishing; 2006; p 185-186.
2. Morisset, M.; Moneret-Vautrin, D. A.; Kanny, G.; Guenard, L.; Beaudouin, E.; Flabbee, J.; Hatahet, R. Thresholds of clinical reactivity to milk, peanut, and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 1046–1051 (2003).
3. Bock, SA.; Muñoz-Furlong, A.; Sampson, HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immun.* **107**, 191-193 (2001).
4. Pomés, A.; Helm, RM. ; Bannon, GA. ; Burks, AW. ; Tsay, A.; Chapman, MD. Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *J. Allergy Clin. Immun.* **111**, 640-645 (2003).
5. Stephan, O.; Vieths, S. Development of a Real-Time PCR and a Sandwich ELISA for Detection of Potentially Allergenic Trace Amounts of Peanut (*Arachis hypogaea*) in Processed Foods. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 3754–3760 (2004).
6. Zeleny, R.; Schimmel, H. Towards comparability of ELISA results for peanut proteins in food: A feasibility study. *Food Chem.* **123**, 1343-1351 (2010).
7. Hird, H.; Lloyd, J.; Goodier, R.; Brown, J.; Reece, P. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 265-268 (2003).
8. Watanabe, T.; Akiyama, H.; Maleki, S.; Yamakawa, H.; Iijima, K.; Yamazaki, F. A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis Hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction. *J. Food Biochem.* **30**, 215-233 (2006).
9. Lopez-Calleja, IM.; de la Cruz, S.; Pegels, N.; Gonzalez, I.; Garcia, T.; Martin, R. Development of a real time PCR assay for detection of allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. *Food Control* **30**, 480-490 (2012).
10. Sun, X.; Guan, L.; Shan, X.; Zhang, Y.; Li, Z. Electrochemical detection of peanut allergen Ara h 1 using a sensitive ADN biosensor based on stem-loop probe. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 10979-10984 (2012).
11. Rubio Retama, J.; Sanchez-Paniagua, M.; Hervas Perez, JP.; Frutos Cabanillas, G.; Lopez-Cabarcos, E.; Lopez-Ruiz, B. Biosensors based on acrylic microgels. A comparative study of immobilized glucose oxidase and tyrosinase. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2268-2275 (2005).
12. Alonso-Lomillo, M.A.; Dominguez-Renedo, O.; Ferreira-Goncalves, L.; Arcos-Martinez, M.J. Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 1333-1337 (2010)
13. Venturini Uliana, C.; Olimpio Tognolli, J.; Yamanaka, H. Application of Factorial Design Experiments to the Development of a Disposable Amperometric ADN Biosensor. *Electroanal.* **23**, 2607–2615 (2011).
14. Montgomery, D.C; Design and Analysis of Experiments; John Wiley & Sons, United States, 2009.
15. Hibbert, DB. Experimental design in chromatography: a tutorial review. *J. Chromatogr. B* **910**, 2-13 (2012).
16. Miranda-Castro, R.; Lobo-Castañón, MJ.; Miranda-Ordieres, AJ.; Tuñón-Blanco, P. Stem-Loop ADN probes for the voltammetric determination of *Legionella pneumophila* on disposable screen-printed gold electrodes. *Electroanal.* **21**, 267-273 (2009).
17. Herne, TM.; Tarlov. MJ. Characterization of ADN probes immobilized on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8916-8920 (1997)
18. Pividori, MI.; Merkoci, A.; Alegret, S. Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 291-303 (2000).
19. Statgraphics Centurion. STATGRAPHICS®. Version XVI. 2012. StatPoint Technologies, Inc www.STATGRAPHICS.com
20. Del Giallo, M.L.; Lucarelli, F.; Cosulich, E.; Pistarino, E.; Santamaria, B.; Marrazza, G.; Mascini, M. Steric Factors Controlling the Surface Hybridization of PCR Amplified Sequences. *Anal. Chem.* **77**, 6324-6330 (2005).
21. Basic Local Alignment Search Tool; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
22. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406-3415 (2003).

23. Levicky, R; Herne, T.M.; Tarlov, M.; Satija, S.K. Using Self-assembly to control the structure of ADN monolayers on gold: a neutron reflectivity study. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 9787-9792 (1998).
24. Lao, R.; Song, S.; Wu, H.; Wang, L.; Zhang, Z.; He, L.; Fan, C. Electrochemical interrogation of DNA monolayers on gold surfaces. *Anal. Chem.* **77**, 6475-6480 (2005).

Sesión científica conmemorativa del Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina y en Química



Juan Ramón Lacadena Calero

Coordinador de la sesión.

Sesión celebrada el 12 de diciembre de 2013.

ORDEN DEL DÍA

Presentación:

“El Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina: control genético del tráfico celular”

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Ponentes:

“Del tráfico de membrana a la comunicación neuronal y las enfermedades mentales”

Dr. José Antonio Esteban García

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC/UAM)

“Nobel de Química 2013: Combinación de métodos de mecánica molecular y mecánica cuántica para entender y predecir procesos químicos complejos”

Dra. Beatriz de Pascual Teresa

El Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina: control genético del tráfico celular

Juan-Ramón Lacadena Ladero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 2 (2014), pag. 394-397.

EL PREMIO NOBEL EN FISIOLOGÍA O MEDICINA

El 7 de octubre de 2013, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo otorgó el Premio Nobel en Fisiología o Medicina conjuntamente a James E. Rothman (1950, USA, Yale University), Randy W. Schekman (1948, USA, University of California, Berkeley) y Thomas C. Südhof (1955, Alemania, Stanford University) “por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema de transporte principal en nuestras células”.

Como señalaba el comunicado de prensa del Instituto Karolinska, el buen funcionamiento de las células depende de conseguir que las moléculas correctas estén en el lugar adecuado en el momento apropiado, teniendo en cuenta que algunas de tales moléculas son exportadas fuera de las células mientras que otras tienen que estar en lugares específicos de la propia célula.

Si fuéramos capaces de introducirnos físicamente en el interior de una célula nos quedaríamos maravillados al visualizar todos los procesos moleculares que ocurren en ella a gran velocidad y con total precisión. Pensemos, por ejemplo, en la replicación del ADN, la transcripción y síntesis del ARN mensajero, la síntesis de proteínas en la maquinaria ribosómica. También nos asombraría ver cómo las moléculas sintetizadas en la célula (enzimas, hormonas, neurotransmisores, citokinas, etc.) son transportadas en vesículas a lugares específicos (orgánulos) de la propia célula o liberadas al exterior de la misma en el momento justo.

En los comentarios escritos para explicar en qué han consistido las investigaciones de los tres científicos galardonados se ha repetido el ejemplo de un gran puerto en el que hay que distribuir ingentes cantidades de mercancías para que lleguen al destino correcto en el tiempo preciso, para lo cual se requiere un sistema de reparto adecuado que genera un denso tráfico interior que tiene que estar perfectamente regulado. Pues bien, volviendo al terreno biológico, las moléculas son empaquetadas en vesículas minúsculas recubiertas con membranas para su transporte a los diferentes lugares específicos de la célula o para ser exportadas al exterior de la misma.

Las investigaciones premiadas se refieren a tres aspectos diferentes, pero a la vez complementarios, de la cuestión global: 1) la existencia de una regulación genética que controla el tráfico de las vesículas (Schekman): 2) la existencia de complejos proteicos que permiten a las vesículas anclarse en el lugar preciso y fusionarse con las membranas celulares o intracelulares (Rothman); y 3) la existencia de un mecanismo molecular dependiente del calcio en la transmisión entre células nerviosas (Südhof).

De las tres investigaciones premiadas yo solamente me siento legitimado para hacer un breve comentario sobre la aportación de Randy W. Schekman quien descubrió los genes que codifican para las proteínas que son los reguladores clave del tráfico de vesículas en levaduras, controlando el transporte tanto a los diferentes compartimentos internos celulares (del retículo endoplásmico al aparato de Golgi) como a la superficie celular. Interesado por cómo las células organizan su sistema de transporte, Schekman decidió iniciar en los años setenta un estudio genético utilizando como sistema modelo mutantes de levadura sensibles a la temperatura (1). Posteriormente identificó 23 grupos de complementación implicados en los sucesos post-traduccionales de la ruta secretora de la levadura (2) y estableció el orden de los sucesos que ocurrían en el patrón secretor de las células de levadura (3). En un estudio posterior, Schekman y colaboradores caracterizaron morfológicamente y genéticamente las mutaciones en siete genes SEC demostrando que pueden jugar un papel en la formación o en la fusión de vesículas intermedias en el transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi (4).

Es interesante hacer constar que las investigaciones realizadas en células de mamíferos por Rothman (5,6), con quien ha compartido el galardón Nobel, sobre los complejos proteicos que permiten a las vesículas fusionarse con sus dianas en las membranas asegurando que las moléculas que las vesículas transportan (moléculas-cargo, moléculas-mercancía) sean liberadas en el lugar preciso han demostrado que incluyen proteínas semejantes a las descritas por Schekman codificadas por genes homólogos. Es decir, se trata de procesos del sistema de transporte celular conservados en la evolución.

Aunque la investigación de los galardonados con el Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina pertenece al campo de la Biología y la Fisiología Celular –de hecho, es la tercera vez desde que George Palade, Albert Claude y Christian de Duve obtuvieron el Premio Nobel en 1974 y Günter Blobel en 1999 en que este campo científico es galardonado con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina– sin embargo en el caso del Dr. Schekman me he permitido incluirlo también en el campo de la Genética por la metodología genética clásica que ha utilizado para seleccionar los mutantes de levadura que han constituido su material de trabajo imprescindible para llevar a cabo sus estudios citológicos. Confirma criterio el

mismo hecho de que el Dr. Schekman eligiera como título de su Nobel Lecture “Genes and proteins that organize the secretory pathway” (7 diciembre 2013).

Termino este breve comentario actualizando los datos numéricos que año tras año vengo ofreciendo: hoy, en 2013, podemos estar orgullosos los amantes de la Genética porque ya son 41 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 90 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 41 premios considerados, 32 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 8 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 90 científicos galardonados, 71 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 18 de Química y 1 de la Paz. Finalmente, me gustaría destacar que en lo que va de siglo XXI se ha premiado la investigación genética en trece ocasiones: en 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”), 2004 (Axel y Buck, “por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo”), 2006 (Fire y Mello, “por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena”), 2006 (Kornberg, “por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica”), 2007 (Capecchi, Evans y Smithies, “por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias”), 2008 (zurHausen, “por su descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical”; Barré-Sinoussi y Montagnier, “por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana”), 2008 (Shimomura, Chalfie y Tsien, “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”), 2009 (Blackburn, Greider y Szostack, “por el descubrimiento de cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa”), 2009 (Ramakrishnan, Steitz y Yonath, “por los estudios de la estructura y función del ribosoma”), 2011 (Bruce A. Beutler y Jules A. Hoffmann “por sus descubrimientos en relación con la activación de la inmunidad innata”; y a Ralph M. Steinman “por su descubrimiento de la célula dendrítica y su papel en la inmunidad adaptativa”, 2012 a John B. Gurdon y Shinya Yamanaka “por el descubrimiento de que las células diferenciadas pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes” y en 2013 a Randy W. Schekman que compartió el premio con James E. Rothman y Thomas C. Südhof “por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema principal de transporte en nuestras células”, demostrando que existe un control genético de la maquinaria que controla el tráfico de vesículas en el interior y al exterior de las células.

Con mucho mayor conocimiento que yo, el Dr. José Antonio Esteban García glosará los trabajos de los tres científicos galardonados con el Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina.

EL PREMIO NOBEL EN QUÍMICA 2013

El 9 de octubre de 2013, la Real Academia de Ciencias de Suecia en Estocolmo acordó conceder el Premio Nobel 2013 en Química conjuntamente a Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel “por el desarrollo de modelos computacionales para sistemas químicos complejos”.

Como decía la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, los químicos usaban bolas y bastones de plástico para crear modelos de moléculas. Hoy, el modelado se realiza en computadores. En los años setenta, Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel pusieron los fundamentos de los poderosos programas de computación que se usan actualmente para comprender y predecir procesos químicos complejos. El acierto de los galardonados con el Premio Nobel ha sido poner a trabajar juntas la física newtoniana clásica y la física cuántica cuando antes había que decidirse por una u otra, cada una con sus fortalezas y debilidades.

Así como en la presentación del Premio Nobel en Fisiología o Medicina me he sentido mínimamente legitimado para hacer un brevísimo comentario sobre la investigación de uno de los galardonados, no es este el caso de las investigaciones premiadas con el Premio Nobel en Química, por lo que cedo el testigo a la Profesora Beatriz de Pascual-Teresa Fernández que glosará las investigaciones de los tres científicos galardonados.

REFERENCIAS

- (1) Novick, P.; Scheckman, R.W. 1979. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *ProcNacAcadSci*, 76:1858-1862.
- (2) Novick, P.; Field, C.; Scheckman, R.W. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21:205-215.
- (3) Novick, P.; Ferro, S.; Scheckman, R.W. 1981. Order of events in the yeast secretory pathways. *Cell*, 25:461-469.
- (4) Kaiser, C.A.; Scheckman, R. 1990. Distinct sets of *SEC* genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell*, 61:723-733.
- (5) Balch, W.E.; Dunphy, W.G.; Braell, W.A.; Rothman, J.E. 1984. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell*, 39:405-416.
- (6) Sollner, T.; Whiteheart, W.; Brunner, M.; Erdjument-Bromage, H.; Geromanos, S.; Tempst, P.; Rothman, J.E. 1993. SNAP receptor implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362:318-324.

Del tráfico de membrana a la comunicación neuronal y las enfermedades mentales

José Antonio Esteban García

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa".

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 2 (2014), pag. 398-407.

El Premio Nobel de Fisiología o Medicina del año 2013 ha estado dedicado a un problema biológico fundamental: ¿cómo se transportan y distribuyen las distintas sustancias y cargamentos en el interior de la célula? ¿y cómo se dirigen las sustancias destinadas a ser liberadas al exterior de la célula? Todas las células contienen un complejo sistema de transporte interno, con carreteras primarias y secundarias, con señales de parada y de avance, con estaciones de servicio y de reparación. La existencia de este sistema de transporte es conocida ya desde los trabajos pioneros de George Palade en los años 1960 (Premio Nobel en 1974), pero sólo en los últimos 20 años se ha conseguido un conocimiento razonablemente completo de su organización y regulación interna, en gran medida gracias a las investigaciones de Randy Sheckman, James Rothman y Thomas Südhof, galardonados este año con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina.

Antes de entrar en más detalle sobre estas investigaciones, incluyo aquí unas pequeñas notas biográficas. Randy Sheckman nació en 1948, en Minnesota, EEUU, y realizó casi todo su trabajo en la Universidad de California, en Berkeley, donde en la actualidad es Profesor en el Departamento de Biología Molecular y Celular. Curiosamente, Randy Sheckman tiene una relación de parentesco científico con el Premio Nobel español Severo Ochoa, ya que realizó su tesis doctoral bajo la supervisión de Arthur Kornberg, en la Universidad de Stanford (EEUU), quien a su vez trabajó con Severo Ochoa en la Universidad de Nueva York (Arthur Kornberg y Severo Ochoa recibieron conjuntamente el Premio Nobel de Medicina o Fisiología el año 1959). Por tanto, Randy Sheckman puede considerarse el "nieto científico" de Severo Ochoa. James Rothman nació en 1950, en Massachusetts, EEUU, e inició sus investigaciones relacionadas con este Premio Nobel en la Universidad de Stanford, precisamente en el departamento en el que unos años antes Randy Sheckman realizaba su tesis doctoral. James Rothman también ha trabajado en la Universidad de Princeton, en el Instituto de Cáncer Memorial Sloan-Kettering y en la Universidad de Columbia. En la actualidad, es Profesor y Catedrático del departamento de Biología Celular de la Universidad de Yale. Thomas Südhof nació en Göttingen, Alemania en 1955. Es por tanto el único investigador no estadounidense de los tres galardonados con este premio. Realizó su tesis doctoral y obtuvo el título de doctor en medicina por la Universidad de

Göttingen. A continuación se trasladó a la Universidad de Texas Southwestern, en EEUU, donde realizó la mayor parte de su trabajo de investigación. En la actualidad es Profesor en el Departamento de Fisiología Molecular y Celular en la Universidad de Stanford.

Desde un punto de vista más anecdótico, Thomas Südhof ha tenido una conexión muy reciente y directa con la universidad española, y en concreto, con el autor de estas líneas. Ello se debe a la celebración de un congreso sobre transporte de membrana en las neuronas, que tuvo lugar del 7 al 9 de octubre del 2013 en Baeza (Jaén), auspiciado por la Universidad Internacional de Andalucía (UNIA) y organizado por Juan Lerma (Instituto de Neurociencia de Alicante), Thomas Schwarz (Harvard Medical School) y yo mismo. Este congreso se había organizado casi con un año de antelación, y Thomas Südhof era uno de los ponentes invitados. La feliz coincidencia fue que el día que Thomas Südhof llegaba a España (desde los Estados Unidos) para participar en este congreso, se le comunicaba la concesión del Premio Nobel. El Instituto Karolinska tiene por costumbre anunciar el resultado a los galardonados por teléfono. En este caso la llamada tuvo lugar mientras Thomas Südhof conducía, en un coche alquilado, desde el aeropuerto de Barajas en Madrid a la sede del congreso en Baeza. Cuando Thomas Südhof atendió la llamada, después de la incredulidad inicial, tuvo que pedir a su interlocutor que esperara un momento mientras detenía el coche, ya que se encontraba “conduciendo por algún lugar en medio de España”. La conversación telefónica completa, junto con su transcripción al español, puede seguirse en <http://www.youtube.com/watch?v=8cZnznOAZMY>. Es realmente un testimonio de la naturalidad y sorpresa con que Thomas Südhof recibió la noticia.

Unas pocas horas más tarde, Thomas Südhof llegaba a Baeza. Para aquel momento nosotros ya sabíamos de la concesión del Premio Nobel, y esperábamos con impaciencia su llegada, junto con los primeros periodistas que empezaban a



agruparse en la sede del congreso. Después de una rápida ducha en el hotel,

Thomas Südhof se reunió con nosotros y atendió a los periodistas, tanto locales como nacionales, que a duras penas habían tenido tiempo para enterarse de la noticia y preparar la entrevista. A pesar de lo improvisado de la situación, todo transcurrió en un ambiente relajado y cordial. Thomas Südhof se prestó siempre de buen ánimo y con una sonrisa a las sucesivas entrevistas y sesiones fotográficas que le fueron pidiendo (conviene recordar que había pasado la noche anterior volando desde California a Madrid, para luego conducir durante tres horas por su cuenta hasta Baeza). Quizá un ejemplo más del buen talante y profesionalidad de Thomas Südhof fue que, concluidas la ronda de entrevistas; nos dispusimos a continuar con el programa científico del congreso... ¡en el que él era el próximo ponente! En efecto, Thomas Südhof entró en la sala de conferencias, donde fue recibido con aplausos y el público en pie. Tras los agradecimientos de rigor, tuvo lugar su conferencia, en la que nos presentó los últimos trabajos que están realizando en el laboratorio, sobre los cuales hablaré un poco más adelante. En conclusión, esta feliz coincidencia, además de crear un poco de revuelo en la tranquila ciudad de Baeza, sirvió para resaltar la importancia del tema de investigación que nos ocupa, y para que los estudiantes (y profesores) tuvieran la oportunidad de conocer y charlar con un Premio Nobel “de carne y hueso”.

Como mencionaba al comienzo, el Premio Nobel de este año reconoce las investigaciones de Randy Sheckman, James Rothman y Thomas Südhof sobre el sistema de transporte en el interior de la célula. Cada célula es una pequeña fábrica que produce y exporta moléculas, ya sean señales químicas para la comunicación nerviosa, o enzimas degradativas en las células que rodean el tubo digestivo. Estas moléculas (o cargamentos) se empaquetan en pequeños compartimentos de membrana llamados vesículas, que son luego transportados por el interior de la célula de una manera exquisitamente dirigida para llegar al lugar correcto en el momento adecuado. El trabajo de estos tres investigadores ha contribuido a elucidar en gran medida cómo este sistema de transporte se organiza y regula en el interior de la célula. Un aspecto interesante de sus investigaciones es que fueron fundamentalmente de índole básica, es decir, no estaban necesariamente encaminadas u orientadas a resolver o tratar una enfermedad o problema social determinado. Por supuesto, como comentaré al final, sus resultados han resultado de gran utilidad para comprender, y en parte aliviar, múltiples enfermedades. Pero es importante resaltar, en estos tiempos de recortes presupuestarios, que la investigación básica siempre encuentra aplicaciones prácticas, muchas veces inesperadas, aunque generalmente a largo plazo. A continuación paso a reseñar brevemente algunos aspectos destacados de la investigación llevada a cabo por estos investigadores.

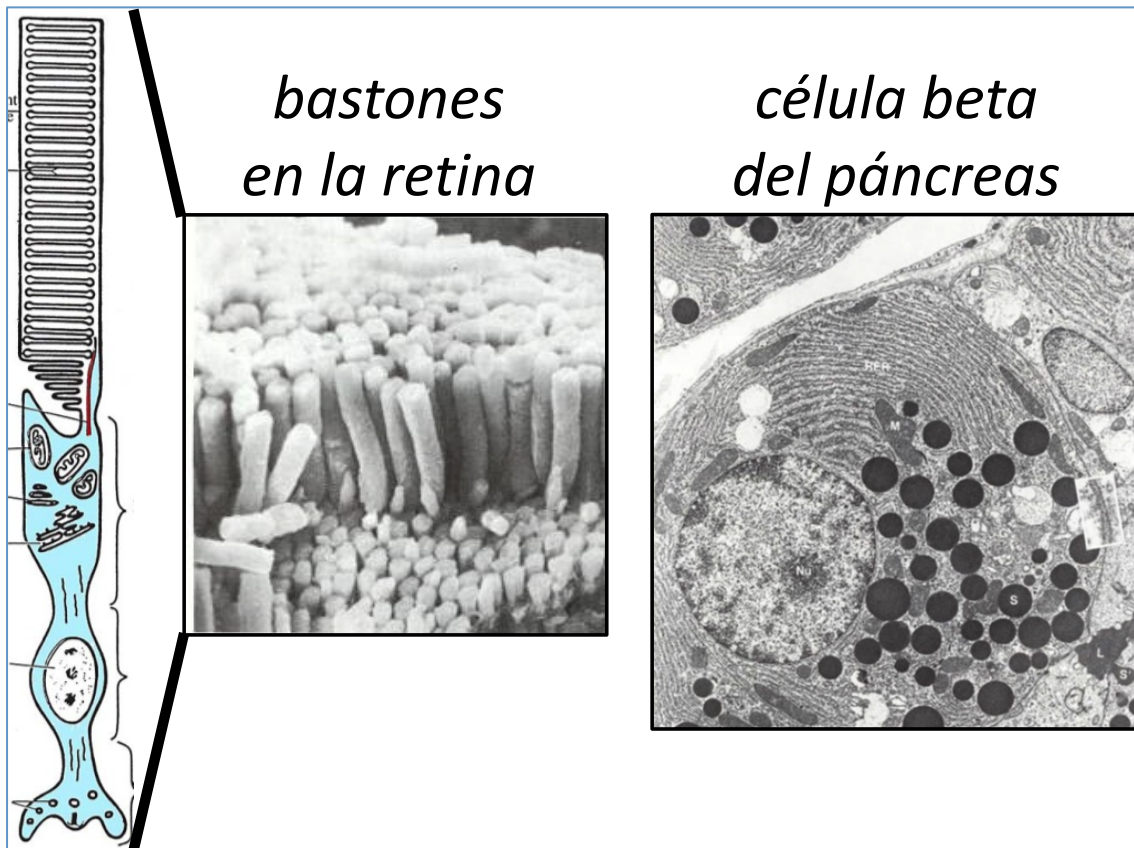
La aproximación de Randy Sheckman fue fundamentalmente genética. La hipótesis básica es que si queremos entender el sistema de transporte de

membrana en la célula, necesitamos conocer los genes que lo gobiernan. Y para abordar este problema, utilizó un organismo cuya manipulación genética es relativamente sencilla, como es la levadura cervecera o *Saccharomyces cerevisiae*. Randy Sheckman estudió multitud de mutantes de levadura en los que el sistema de transporte era defectuoso. Utilizando técnicas de bioquímica y microscopía, observó cómo en algunas cepas de levadura se producían “atascos” en el tráfico intracelular, con lo que determinados cargamentos no llegaba al lugar adecuado. A continuación, empleando estrategias de genética clásica, clasificó las cepas mutantes y aisló los genes cuya mutación producía los defectos de transporte. De esta forma fue capaz de generar un mapa anatómico y funcional, en el que distintos genes controlan pasos específicos en el transporte de membrana entre distintos compartimentos en el interior de la célula. Esta cartografía diseñada sobre la célula de levadura es esencialmente la que se utiliza hoy en día para entender el funcionamiento interno de células tan dispares como las neuronas o las células secretoras de insulina en el páncreas.

El trabajo de James Rothman consistió fundamentalmente en la disección bioquímica del proceso de fusión de membrana. La liberación de moléculas al exterior de la célula (como es el caso de los neurotransmisores en las neuronas o las hormonas en las células de las glándulas endocrinas) requiere que las vesículas que las contienen se fusionen con la membrana exterior de la célula, produciendo el volcado de su contenido. También para el transporte intracelular, distintas vesículas tienen que fusionarse con otras membranas internas, para transferir su contenido de un compartimento a otro. Este transporte es extremadamente específico, para evitar la mezcla de cargamentos en los compartimentos incorrectos y el caos intracelular. James Rothman descubrió una serie de proteínas que se anclan específicamente en distintas vesículas o en la superficie de la célula, y fuerzan la fusión de las membranas en los sitios adecuados. Para ello utilizó células de mamífero, sobre las que empleó técnicas de fraccionamiento y purificación de distintos compartimentos de membrana. De esta forma, por primera vez, se identificaron componentes de la maquinaria molecular que ejecuta el transporte y la fusión de las membranas. Quizá uno de los resultados más interesantes fue comprobar que algunas de las proteínas encontradas con estos estudios bioquímicos con células de mamífero eran las mismas que se codificaban por los genes que había encontrado Randy Sheckman con sus estudios en levadura. Esta coincidencia revela y refuerza la conservación evolutiva de estos mecanismos como procesos fundamentales en el funcionamiento de todas las células eucariotas.

Precisamente el trabajo de Thomas Südhof está encaminado a entender estos mecanismos en una de las células más evolucionadas y especializadas que se conocen, como son las neuronas en el cerebro. Aquí el proceso que se estudió fue la

liberación de neurotransmisor, que permite la comunicación de una neurona a otra. Todos los requerimientos de regulación y especificidad de la fusión de membranas, están llevados al máximo en el caso de la comunicación neuronal. Así, las vesículas que contienen los neurotransmisores pueden permanecer inmóviles, ancladas durante horas o días en las terminales nerviosas, conocidas como sinapsis. Luego, cuando llega el estímulo nervioso (potencial de acción), la fusión de la vesícula con la membrana sináptica se dispara a gran velocidad, en tiempos inferiores a un milisegundo. Esta precisión y rapidez son fundamentales para la comunicación nerviosa, y son la base del funcionamiento cerebral, desde la percepción de estímulos del exterior, hasta la ejecución de complicados movimientos o los procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. Curiosamente, cuando Thomas Südhof comenzó estos estudios, en los años 1990, se desconocía prácticamente en su totalidad la maquinaria molecular de las vesículas de neurotransmisor. Y aunque era de esperar que parte de esta maquinaria fuera común y compartida con la que opera en otros tipos celulares para la fusión de membranas, parecía obvio que tenía que haber adaptaciones y especializaciones que “acoplaran” esta maquinaria a los estímulos nerviosos. Antes del comienzo de estas investigaciones ya se conocía que un factor fundamental en este acoplamiento son los iones de calcio (Ca^{2+}). La llegada del potencial de acción a la terminal sináptica provoca la entrada de Ca^{2+} a través de unos canales iónicos específicos, y esta acumulación de Ca^{2+} es necesaria para la liberación del neurotransmisor. Una de las contribuciones fundamentales del laboratorio de Thomas Südhof ha sido la identificación de una serie de proteínas en las vesículas de neurotransmisor que unen Ca^{2+} y actúan como sensores que detectan la llegada del potencial de acción y disparan con gran rapidez la fusión de membrana. De esta forma ha sido posible entender la exquisita precisión temporal de la comunicación nerviosa. Además, estas investigaciones supusieron un cambio conceptual, al descubrir que la fusión de membrana podía ocurrir de forma regulada, en respuesta a estímulos determinados. Ahora se sabe que este no es sólo el caso de las neuronas, sino también el de la mayor parte de las células endocrinas, del sistema inmune y otros tipos celulares.



En conclusión, los estudios distinguidos con el Premio Nobel de Medicina de este año nos han llevado en dos direcciones complementarias. Por un lado, nos han permitido entender los mecanismos básicos del transporte intracelular de membrana, que operan en todas las células eucariotas y son fundamentales para su organización interna y correcto funcionamiento. Por otro lado, nos han ofrecido un ejemplo de cómo estos mecanismos pueden adaptarse a los requerimientos específicos de distintos tipos celulares, como es el caso de la liberación de neurotransmisor en las neuronas. De hecho, la mayoría de las investigaciones actuales en este campo se concentra en entender las distintas especializaciones y mecanismos de regulación del transporte de membrana en distintos tejidos y tipos celulares. Algunas de estas adaptaciones son realmente notables. Por ejemplo, las células fotorreceptoras en la retina, conos y bastones (arriba a la izquierda), están tremendamente polarizadas. En su segmento externo forman unos discos de membrana donde se concentra la proteína sensible a la luz, la rodopsina. La mayor parte de la energía de esta célula se destina a la formación de estos discos de membrana y al empaquetamiento de la rodopsina, en concentraciones casi cristalinas, en su interior. Además, esta especialización está sometida a una continua renovación, al irse perdiendo los discos de membrana más externos y ser sustituidos por discos más internos que se van desplazando hacia el exterior. Otro ejemplo notable son las células productoras de insulina en el páncreas (células beta). Estas células son auténticas factorías, en las que casi la totalidad de su

sistema de transporte de membrana está destinado a la síntesis, empaquetamiento, procesamiento y liberación de insulina. De hecho, gran parte de su contenido celular está ocupado por los gránulos de secreción (arriba a la derecha).

Dada la importancia del sistema de transporte de membrana para los distintos tipos celulares, no es sorprendente que su alteración dé lugar a una gran variedad de enfermedades. De hecho, es gracias al conocimiento de este sistema que hemos podido entender la base genética y molecular de múltiples enfermedades en humanos. A continuación menciono sólo unos pocos ejemplos para poner de relieve la variedad de patologías que pueden producirse.

Tejidos estructurales como los huesos o cartílagos están basados en la producción de una compleja matriz extracelular, que es la que da consistencia al tejido. En su mayor parte, esta matriz está compuesta por proteínas altamente modificadas que son producidas por osteoblastos y condrocitos (células generadoras de hueso y cartílago, respectivamente). Estas proteínas tienen que ser empaquetadas y secretadas al medio exterior utilizando esencialmente los mismos mecanismos de transporte descritos anteriormente. Cuando estos mecanismos fallan, la formación de huesos y cartílagos es defectuosa, lo que da lugar a graves malformaciones durante el desarrollo. Es el caso, por ejemplo, de mutaciones en la proteína *GMAP-210*, que se encarga de organizar el aparato secretor y anclarlo al citoesqueleto de los condrocitos. Al fallar el aparato secretor, se produce la acumulación intracelular de una proteína de la matriz del cartílago, el perlecan, lo que impide la correcta formación del cartílago (acondrogénesis tipo IA).

Otro órgano que depende en gran medida de los sistemas de tráfico intracelular es el riñón. Aquí se produce una intensa actividad de filtración e intercambio de sustancias, que depende de la correcta localización de multitud de proteínas que actúan como transportadores moleculares. En el caso del *síndrome de Lowe*, se encuentra mutada la proteína *OCRL1*. Esta proteína se encarga del metabolismo de unos lípidos de membrana específicos, los fosfoinosítidos, cuya correcta localización es fundamental para la organización del sistema de transporte intracelular. La falta de esta proteína da lugar a alteraciones oculares, cerebrales y renales, que constituyen el síndrome de Lowe (de ahí el nombre de la proteína, *OCRL*).

Finalmente, un órgano que depende críticamente del transporte de membranas, como mencionaba anteriormente, es el cerebro, debido a los requerimientos de la comunicación neuronal. Hay multitud de enfermedades mentales debidas, directamente o indirectamente, a defectos en el proceso de transporte intracelular de membrana. Por ejemplo, mutaciones en la proteína *Rab39b* da lugar a una acumulación defectuosa de vesículas de neurotransmisor en

la terminal sináptica, lo que conduce a una forma de retraso mental asociada al cromosoma X. Las disfunciones pueden ser más sutiles. Por ejemplo, la proteína *Rab7a* se encarga de dirigir cargamentos para su degradación en el interior de la célula, en un orgánulo especializado llamado lisosoma. Cuando esta proteína está mutada se produce una acumulación de “basura intracelular” que no puede eliminarse, lo que acaba desencadenando la degeneración neuronal. Es el caso de la neuropatía Charcot-Marie-Tooth tipo 2B (la neuropatía Charcot-Marie-Tooth es muy compleja, con más de 60 genes asociados). Pero no todas las alteraciones cerebrales se deben a defectos en el funcionamiento de las neuronas. Por ejemplo, en la transmisión nerviosa, el neurotransmisor es liberado y se une a receptores específicos en la neurona adyacente. A continuación, es importante eliminar el exceso de neurotransmisor con gran rapidez, para terminar la transmisión y permitir que la neurona se prepare para el siguiente estímulo. Además, un exceso de neurotransmisor en el medio extracelular puede dar lugar a una excitación excesiva de la neurona, en un proceso conocido como excitotoxicidad. Pues bien, la eliminación del exceso de neurotransmisor se lleva a cabo por otro tipo celular, los astrocitos, que se encuentran en gran proximidad a la terminal sináptica. Estas células presentan en su membrana unos transportadores que se encargan de captar el neurotransmisor y transportarlo al interior de la célula. Es por tanto muy importante que estos transportadores específicos se encuentre localizados correctamente en la membrana del astrocito. Cuando esto no ocurre, puede dar lugar a distintas formas de epilepsia, y finalmente, a la muerte neuronal.

Este es sólo un pequeño “muestuario” de las enfermedades humanas que pueden producirse cuando el sofisticado tráfico intracelular se encuentra alterado. Como decía, esta información nos ha ayudado notablemente a entender mejor estas enfermedades. Pero ¿ha sido esto útil para el diseño de nuevos tratamientos para estas enfermedades? Sí, sin duda ha sido útil, pero hay que reconocer que lo ha sido fundamentalmente para aliviar o paliar los síntomas de estas enfermedades, más que para corregir sus causas. Esto es así porque en gran manera nuestro conocimiento es todavía demasiado incompleto, y sobre todo, porque carecemos de herramientas lo bastante finas como revertir los procesos moleculares defectuosos que originan estas enfermedades. Aun así, el progreso es continuo, y hay múltiples terapias en fase experimental para el tratamiento de alguna de estas enfermedades. Por ejemplo, la enfermedad de Niemann-Pick se debe a la acumulación intracelular de distintos lípidos de membrana, como la esfingomielina, fundamentalmente en los lisosomas. Esto se debe a deficiencias en la enzima que degrada la esfingomielina, la esfingomielinasa. Basado en este conocimiento, se están ensayando dos tipos de terapias moleculares. Por un lado, se intenta prevenir la acumulación excesiva de esfingomielina reduciendo su producción. Para ello se están utilizando inhibidores específicos de las enzimas que regulan su síntesis. Por otro lado, se está intentado recuperar la capacidad de

degradar esfingomielina por la célula, utilizando activadores de enzimas alternativas.

Otro ejemplo importante es el de la fibrosis quística. Esta enfermedad se debe a mutaciones en un canal de cloruro que se encuentra en la membrana de las células que recubren los alveolos pulmonares. Cuando este canal no está presente, se producen alteraciones osmóticas en estas células que dan lugar a una secreción excesiva de mucosidad. Además de problemas respiratorios crónicos, esta condición produce graves peligros de infección pulmonar, que pueden llegar a ser mortales. En múltiples casos de esta enfermedad, las mutaciones en el canal de cloruro no eliminan completamente la proteína, sino que producen defectos en su plegamiento molecular, lo cual provoca su retención en compartimentos intracelulares. El plegamiento de proteínas de membrana en el interior de la célula es un proceso muy complejo, que viene asistido por múltiples proteínas conocidas como “chaperonas moleculares”. Por tanto, para el tratamiento de esta enfermedad, se están ensayando distintas aproximaciones farmacológicas que mejoren en cierta medida el plegamiento molecular, y por tanto, conseguir que una mayor proporción de canales mutados lleguen a la superficie celular y lleven allí a cabo sus labores de transporte iónico.

Otros casos notables son las enfermedades debidas a acumulaciones o agregados proteicos, como son la enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson, que acaban produciendo la muerte neuronal. En estos casos se están ensayando distintas aproximaciones para “disolver” estos agregados, con la esperanza de que así se recupere el normal funcionamiento de las neuronas afectadas. Sin embargo, estas estrategias no carecen de riesgos. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Alzheimer, los agregados son conocidos como placas de amiloide, y están producidas por la agregación extracelular de un pequeño péptido (péptido beta-amiloide) debido a la excesiva secreción por parte de las neuronas. En un principio se consideró que el principal agente patológico eran las placas de amiloide, y por tanto, la estrategia consistía en su disgregación. Sin embargo, ahora sabemos que el agente tóxico fundamental es el propio péptido, antes de formar agregados. Este péptido altera el correcto funcionamiento de la sinapsis, dando lugar a problemas de memoria mucho antes del comienzo de la muerte neuronal. De hecho, se ha comprobado en modelos animales que la disolución de las placas de amiloide produce la movilización de grandes cantidades del péptido amiloide, con el consiguiente empeoramiento de la función cognitiva. Sirva esto como ejemplo de la importancia del conocimiento de los mecanismos básicos de una enfermedad para el correcto diseño de posibles intervenciones terapéuticas.

Por tanto, como decía, el conocimiento de los mecanismos de transporte de membrana en la célula ha abierto múltiples avenidas terapéuticas para el

tratamiento de enfermedades. Sin embargo, hay que reconocer que la mayoría se encuentran todavía en fases tempranas de desarrollo. No por ello hemos de minimizar las aplicaciones prácticas de este conocimiento. En la mayor parte de los casos estamos hablando de resultados científicos generados en los últimos 10 años, y por tanto creo que podemos ser optimistas acerca de las aplicaciones clínicas que en un futuro próximo estarán basadas en este conocimiento. Estoy seguro de que esto servirá de gran regocijo para investigadores básicos como Randy Schekman, James Rothman y Thomas Südhof, que difícilmente podrían haber imaginado, al comienzo de sus investigaciones, la gran relevancia que acabaría teniendo su trabajo para la salud humana.

Nobel de Química 2013: combinación de métodos de mecánica molecular y mecánica cuántica para entender y predecir procesos químicos complejos

Beatriz de Pascual-Teresa

Departamento de Química y Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU.

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 2 (2014), pag. 408-432.

RESUMEN

La Real Academia Sueca de Ciencias ha decidido otorgar el Premio Nobel de Química 2013 al investigador austríaco Martin Karplus, Profesor de la Universidad de Strasbourg, Francia y Profesor Emérito de la Universidad de Harvard, USA, al sudafricano Michael Levitt, Profesor de la Universidad de Stanford, USA, y al israelí Arieh Warshel, Profesor de la Universidad del Sur de California, USA, por “el desarrollo de modelos multiescala para sistemas químicos complejos”. Los trabajos galardonados con el Premio Nobel de Química de este año se centran en el desarrollo de métodos que utilizan tanto la mecánica molecular como la mecánica cuántica. Sin embargo, a pesar del impresionante avance en software y hardware, el estudio de sistemas complejos, con un elevado número de átomos, como es el caso de las biomoléculas, presenta bastantes dificultades. Para poder llevar a cabo el modelado de las reacciones enzimáticas y otros procesos biomoleculares que implican cambios en la estructura electrónica, tales como formación y ruptura de enlaces covalentes o transferencia de carga, la utilización combinada de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM/MM) se ha convertido en el método de elección, siguiendo una idea inicialmente formulada por los investigadores premiados este año.

Palabras clave: Mecánica Molecular; Dinámica Molecular; Mecánica Cuántica; QM/MM; Reactividad Química

ABSTRACT

Nobel Prize in Chemistry 2013: combination of molecular mechanics and quantum mechanics for understanding and predicting complex chemical processes

The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the Nobel Prize in Chemistry for 2013 to Austrian researcher Martin Karplus, Professor of the Université de Strasbourg, France and Emeritus Professor at Harvard University, USA, to South African Michael Levitt, Professor at Stanford University, USA, and Israeli Arieh Warshel, Professor at University of Southern California, USA “for the

development of multiscale models for complex chemical systems". The work awarded with the Nobel Prize in Chemistry this year focuses on the development of methods that use both molecular mechanics and quantum mechanics. However, despite the impressive advances in software and hardware, the study of complex systems with a large number of atoms, such as biomolecules, is quite challenging. To carry out modeling of enzymatic reactions and other biomolecular processes involving changes in electronic structure, such as formation and breaking of covalent bonds or charge-transfer processes, the combined use of quantum mechanics and molecular mechanics (QM/MM) has become the method of choice, following an idea originally formulated by this year's awarded researchers.

Keywords: Molecular Mechanics; Molecular Dynamics; Quantum Mechanics; QM/MM; Chemical Reactivity.

1. INTRODUCCIÓN

La química y la bioquímica se han desarrollado muy rápidamente en los últimos 50 años. En la primera mitad de este periodo ha sido especialmente llamativo el desarrollo de la determinación estructural de macromoléculas, primero a través de la cristalografía de rayos X y después con el desarrollo de los métodos de resonancia magnética nuclear. Ambas metodologías han sido galardonadas con premios nobel en química. Sin embargo, la estrategia menos conocida es la aplicación de métodos computacionales para analizar el patrón de difracción de rayos X, los acoplamientos spin-spin obtenidos a partir de un experimento de RMN, la energía de un estado de transición, la reactividad de una enzima, etc. En estas situaciones no existe suficiente información experimental que permite determinar la estructura del sistema. La teoría es un complemento necesario para experimentar.

Los ordenadores y los modelos teóricos se han convertido en herramientas esenciales para el químico experimental. Como resalta la Real Academia de Ciencias de Suecia, "hoy en día el ordenador es tan importante para un químico como un tubo de ensayo". Estos modelos informáticos se han convertido en uno de los avances más cruciales para la química del siglo XXI.

Los trabajos galardonados con el Premio Nobel de Química de este año se centran en el desarrollo de métodos que utilizan tanto la mecánica molecular como la mecánica cuántica. Sin embargo, a pesar del impresionante avance en software y hardware, el estudio de sistemas complejos, con un elevado número de átomos, como es el caso de las enzimas, presenta bastantes dificultades. Para poder llevar a cabo el modelado de las reacciones enzimáticas y otros procesos biomoleculares que implican cambios en la estructura electrónica, tales como formación y ruptura de enlaces covalentes o transferencia de carga, la utilización combinada de

mecánica cuántica y mecánica molecular (QM / MM) se han convertido en el método de elección, siguiendo una idea que inicialmente fue formulada por los investigadores premiados este año. El elemento básico de esta idea consiste en la siguiente aproximación: el sistema en estudio se divide en dos partes, la parte reactiva y el entorno. La parte reactiva, asociada a los procesos de formación y ruptura de enlaces químicos, se trata mediante métodos mecánico cuánticos, QM, mientras que para el entorno (disolvente o resto de la proteína), que constituye la parte que consumiría mayores recursos computacionales, se aprovecha la eficiencia computacional de la mecánica clásica. Debido a que las dos regiones en general interactúan fuertemente, no es posible escribir la energía total de todo el sistema simplemente como la suma de las energías de los subsistemas. Los términos de acoplamiento tienen que ser considerados, y es necesario tomar precauciones en el límite entre los subsistemas, especialmente si la frontera de separación corta a través de enlaces covalentes.

La química computacional nació con los primeros ordenadores, a mediados del siglo XX, aplicando los conceptos de la mecánica cuántica para caracterizar moléculas sencillas. Los cálculos de este tipo requieren mucho tiempo de cálculo y ordenadores potentes, lo que hace que aun hoy su ámbito de aplicación sea generalmente el estudio detallado de moléculas pequeñas (el sustrato de una enzima, un fármaco, etc.). Esta limitación se debe a la elevada precisión de los métodos cuánticos, que consideran todos los átomos presentes en las moléculas, pero que además describen de forma explícita el comportamiento de los electrones.

El primer paso para poder aplicar la química computacional al estudio de procesos biológicos vino a través de una simplificación: describir las moléculas únicamente a nivel atómico, sin tener en cuenta los electrones. Nació así la mecánica molecular a finales de los años sesenta, en el grupo del fallecido Lifson, en el Weizmann Institute de Israel, donde Arieh Warshel estaba haciendo su tesis doctoral y adonde Michael Levitt llegó como estudiante predoctoral. Dos jovencísimos investigadores que escribieron el primer programa de mecánica molecular al inicio de la década de los setenta, con el que pocos años después realizarían la primera simulación computacional de una proteína. Finalmente podían describirse algunas propiedades de proteínas o ácidos nucleicos, como su movilidad en condiciones fisiológicas, la dinámica molecular.

Sin embargo, quedaba por resolver el problema de los sistemas complejos, como la reactividad o la asociación entre moléculas (reconocimiento molecular) y aquí vino la principal contribución de los galardonados. Cuando Arieh Warshel hizo su estancia posdoctoral en la Universidad de Harvard con Martin Karplus a principios de los años 70, utilizaron un nivel de detalle mayor para el centro reactivo, mientras el entorno donde sucede la reacción, típicamente una proteína

catalítica o enzima, era descrito de forma más aproximada. Nació así la simulación multiescala, o hermanamiento de las diferentes escalas de descripción molecular como pueden ser la química cuántica y la mecánica molecular.

A mitad de los 70, Warshel y Levitt extendieron esta aproximación a sistemas moleculares más grandes, como la acción de un inhibidor de la tripsina pancreática y a la formación del ión carbonio en el sitio activo de la lisozima. (1)

Esta metodología ha sido posteriormente utilizada con éxito para estudiar los procesos complejos no sólo en química orgánica y bioquímica, sino también en catálisis heterogénea, cálculos de valores de pKa, propiedades redox, predicción de propiedades espectroscópicas. Pero lo más importante es que ha abierto una cooperación fructífera entre los químicos experimentales y teóricos, permitiendo solucionar problemas que hace unos años no podrían ser abordados con detalle y han contribuido de forma especialmente importante en muchos campos, entre otros el del diseño de fármacos.

2. MECANICA CUANTICA

La química cuántica aborda la dinámica y distribución de electrones en un sistema molecular, en forma de función de onda molecular, ψ . Esta, se relaciona con la energía del sistema mediante la ecuación de Schrödinger, que si consideramos su formulación independiente del tiempo, toma la forma de la siguiente ecuación diferencial:

$$H\psi_{(r)} = E\psi_{(r)} \quad 1)$$

H es un operador (llamado Hamiltoniano) asociado a la energía cinética y potencial de núcleos y electrones. Esta ecuación es una "ecuación de valores propios" (*eigenvalue*), debido a que el operador H , actuando sobre la función ψ , produce un múltiplo de la función, en este caso, multiplicada por el valor de la energía, E , correspondiente al estado descrito por la función de onda. La resolución de esta ecuación nos llevará a varias soluciones posibles, correspondientes a estados estacionarios de la molécula, cada uno caracterizado por una determinada función de onda ψ con un valor de E asociado a ella. La solución que obtiene el menor valor de energía corresponde al estado basal (*groundstate*). La obtención de soluciones de esta ecuación, salvo para casos muy sencillos, es compleja, y requiere la introducción de una serie de aproximaciones:

- Aproximación de Born-Openheimer: asume que el movimiento de los núcleos se puede desacoplar del movimiento de los electrones, debido a la pequeña masa de estos respecto a los núcleos.
- Descripción de los orbitales atómicos mediante un determinante de

Slater (para cumplir el principio de exclusión de Pauli).

• Aproximación de Roothaan, en la que cada orbital molecular monoeléctrico se construye de acuerdo con la aproximación LCAO (*Linear Combination of Atomic Orbitals*), como una combinación lineal de N orbitales atómicos (ϕ), también llamados funciones de base:

$$\psi_{(r)} = \phi_1(r_1)\phi_2(r_2)\dots\phi_n(r_n) \quad 2)$$

en el que cada orbital molecular monoeléctrico se expresa, de acuerdo con la aproximación LCAO (*Linear Combination of Atomic Orbitals*), como una combinación lineal de N orbitales atómicos (ϕ), también llamados funciones de base:

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^N c_{\mu i} \chi_{\mu} \quad 3)$$

A su vez, cada función de base se puede expresar de forma análoga como una combinación lineal de una serie de funciones matemáticas de tipo gaussiano. La calidad de la aproximación dependerá del conjunto de funciones utilizado para dichas combinaciones lineales (*basis set*). Actualmente es frecuente utilizar una función de base 6-31G* para calcular propiedades de moléculas orgánicas pequeñas (tipo fármaco). 6-31G* indica que se utilizan seis funciones gaussianas para representar los orbitales atómicos internos, mientras que los externos -capa de valencia- se representan mediante tres funciones para la parte “contraída” y una para la parte “difusa”, más una función de polarización para átomos pesados (indicada mediante el asterisco *), que representa el efecto de los orbitales tipo *d*. Existen, no obstante, otras funciones de base menos costosas, que se pueden utilizar para la búsqueda de la geometría óptima, como son las bases STO-3G ó 3-21G.

Debido a que cada electrón se halla bajo el campo eléctrico del resto, cada orbital molecular monoeléctrico dependerá de los demás, con lo que la búsqueda del mejor conjunto de coeficientes se hará de forma iterativa. Esta aproximación recibe el nombre de campo autocohérente (*Self-Consistent Field, SCF*). Dentro de los métodos que utilizan cálculos SCF cabe destacar el método Hartree-Fock (HF), que es el de mayor difusión en el diseño de fármacos. Las ecuaciones de Hartree-Fock buscan la función de onda que produzca el mínimo de energía de un sistema molecular, es decir, imponen la condición de que la energía sea cero ($\nabla E=0$) sujeta a su vez a la condición de que los orbitales moleculares sean ortonormales (teorema variacional).

Todos estos métodos, debido a que consideran toda la estructura atómica y no introducen parámetros empíricos en la resolución de la ecuación de

Schrödinger, se denominan métodos *ab initio*. En cuanto a los programas con los que se realizan cálculos químico-cuánticos *ab initio*, entre los más comunes están el paquete GAUSSIAN(2) y GAMESS.(3)

Cuando se introducen parámetros ajustados empíricamente que sustituyen alguna de las integrales de los métodos *ab initio*, pero aún consideramos la estructura electrónica de la molécula, nos hallamos ante los denominados métodos semiempíricos. Estos métodos omiten los cálculos relativos a los electrones de capa interna (*core*) que se tratan como si formasen parte del núcleo, y se centran únicamente en los electrones de capas de valencia, partiendo de la base de que son estos electrones los responsables de la reactividad y de la mayoría de las propiedades moleculares. No obstante, no existen parámetros válidos para todos los sistemas moleculares, lo cual hace aconsejar prudencia en su utilización. Se han desarrollado multitud de métodos semiempíricos, entre los cuales destacan, por lo común de su utilización en el campo del diseño de fármacos, MNDO(4) o AM1.(5)

De la función de onda se pueden derivar multitud de descriptores moleculares, que pueden ser utilizados en la caracterización de moléculas. Entre estos cabe citar:

- Potencial electrostático molecular (MEP): Esta propiedad es de gran interés en el modelado molecular ya que describe las características electrónicas de las moléculas y se puede utilizar en el análisis y predicción de interacciones moleculares.
- Entalpía de formación (DHf): derivada del cálculo de la energía, da cuenta de la estabilidad de un compuesto. Puede ser calculada en distintos entornos (agua, solventes orgánicos, etc...) en los métodos que consideran medios distintos del vacío.
- Momento dipolar (m): es una magnitud vectorial relacionada con la asimetría de la distribución de carga de un compuesto; da una idea de su polaridad.
- Energía de los orbitales moleculares: tienen especial interés la del orbital ocupado de mayor energía (HOMO, *highestoccupied molecular orbital*) y la del desocupado de menor energía (LUMO, *lowestunoccupied molecular orbital*). Ambos están implicados en interacciones intermoleculares de transferencia de carga.
- Cargas puntuales: Los electrones de valencia de las moléculas no están fijados a un átomo en particular y se pueden mover alrededor de la molécula como un conjunto. Debido a que los electrones suelen estar más tiempo en las proximidades de los átomos electronegativos que en la de los electropositivos, esta distribución electrónica no es uniforme y tiene como resultado que unas regiones

de las moléculas posean una densidad de carga positiva y otras partes una densidad de carga negativa. La carga puntual es una estimación del promedio de carga de cada átomo que se deriva del número de electrones presentes a su alrededor.

Haciendo referencia a los avances en el área de la química computacional, Martin Karplus, en un artículo autobiográfico publicado en 2006(6), menciona:

“Ahora, pueden ser calculadas apretando un botón de un programa, como el ampliamente utilizado Gaussian. El alto nivel de cálculos ab initio que se utilizan hoy en día de forma rutinaria posee el inconveniente de que aunque los resultados sean exactos, la visión que se tenía con las aproximaciones anteriores simplificadas, se pierden con frecuencia en la complejidad del cálculo”

2.1. Aplicaciones de la química cuántica:

2.1.1. Reacción de fotoisomerización del retinal para la excitación visual.

Un ejemplo de utilización de esta metodología para el estudio de sistemas biológicos, fue el realizado por Barry Honig, bajo la dirección de Martin Karplus, el cual consideró que era un sistema biológico en el que los efectos cuánticos eran suficientemente interesantes y que podría ser tratado con los medios disponibles en ese momento. Además, contaba en su grupo de investigación con la persona preparada para realizar ese tipo de cálculos.

Mediante este estudio, fueron capaces de predecir que la conformación más estable era 12-s-cis. Este trabajo, a pesar de ser un trabajo teórico y no sin ciertas dificultades, fue finalmente publicado en la revista Nature(7).

Unos meses más tarde, se resolvió la estructura de rayos-x, prácticamente coincidente con los estudios teóricos(8).

2.1.2. Desarrollo de anticuerpos catalíticos

Existen miles de ejemplos de la utilización de estos métodos, sin embargo he seleccionado una estrategia que supuso, en los años 90, una nueva aproximación en la búsqueda de anticuerpos catalíticos para catalizar diferentes reacciones orgánicas.

Los anticuerpos catalíticos se presentan como una herramienta con un futuro prometedor en campos como la síntesis química, la farmacología e incluso la medicina, gracias, entre otras cosas al gran progreso de las técnicas de generación de anticuerpos monoclonales. En ellos se combina la excepcional capacidad del sistema inmune para generar grandes colecciones de moléculas con gran afinidad por las moléculas que las inducen -antígenos-, con el poder catalítico de las enzimas. La principal complejidad que presenta el desarrollo de esta técnica está en el diseño de haptenos -pequeñas moléculas inmunogénicas- que han de ser análogos de los estados de transición de las reacciones químicas que deseamos

catalizar. Los estudios en el campo de la elucidación de los complejos enzima-sustrato en los estados de transición aportan, sin embargo, datos esenciales para el desarrollo de este campo de investigación(9).

Una de las reacciones que ofrece un especial atractivo para el desarrollo de esta estrategia es la reacción de Diels-Alder. Los anticuerpos, con sus sitios de unión específicos y quirales, deberían de ser catalizadores ideales para controlar por completo esta reacción de cicloadición.

La reacción de Diels-Alder seleccionada para este trabajo, es aquella en la que se hace reaccionar el *trans*-1-*N*-acilamino-1,3-butadieno con la *N,N*-dimetilacrilamida. Los productos de esta reacción pertenecen a una familia de compuestos útiles en la síntesis de alcaloides.

En ausencia de catalizador se obtiene a 110° en tolueno una mezcla endo/exo 66:34. En presencia de catalizador se obtiene una mezcla 85:15. Ambas reacciones son totalmente regioselectivas obteniéndose únicamente los regioisómeros orto.

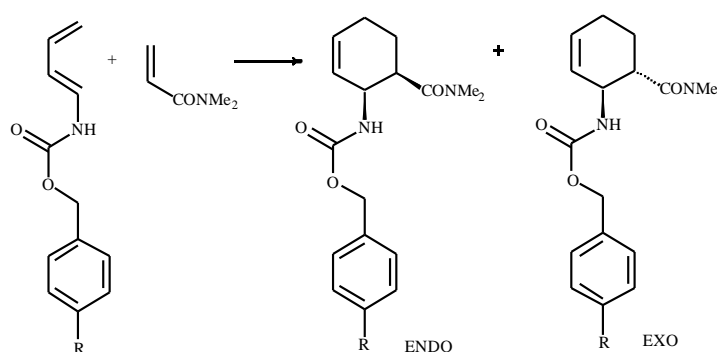


Figura 1.- Reacción Diels-Alder seleccionada.

La idea era obtener dos “diles-alderasas” capaces de catalizar la reacción para obtener tanto el producto de cicloadición favorecido endo o, lo que era más complicado el cicloaducto desfavorecido exo. Para ello era necesario diseñar un hapteno, análogo estable del estado de transición, que permitiese la obtención de los dos anticuerpos (Figura 2).

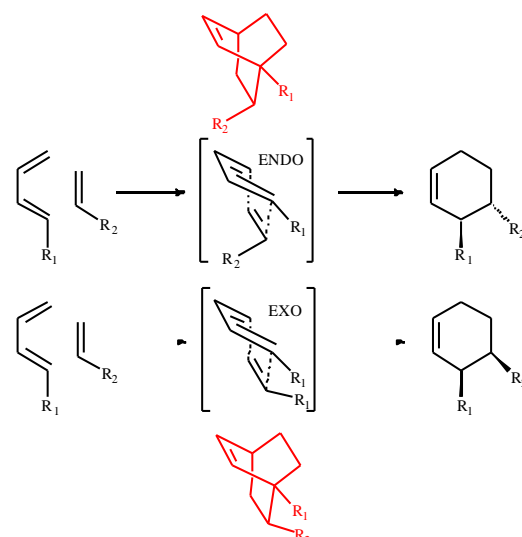
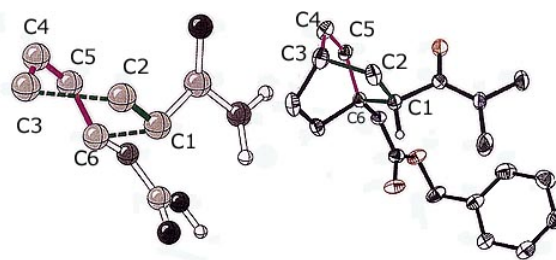


Figura 2.-Haptenos diseñados para obtener el producto "endo" y "exo" de la reacción Diels-Alder por similitud con el estado de transición.

Con el fin de llevar a cabo el diseño racional de los haptenos, se localizaron los correspondientes estados de transición, para poder obtener datos estereoelectrónicos de la reacción que se deseaba catalizar. Se utilizó el método *ab initio* y el nivel de cálculo RHF/3-21G para localizar los estados de transición en un sistema modelo constituido por acrilamida y el ácido *N*-(1-butadienil) carbámico. Previamente se realizó un estudio conformacional de los reactivos. Se localizaron los cuatro estados de transición correspondientes a los cuatro estereo (endo/exo)-y regioisómeros (orto/meta) (orto endo, orto exo, meta endo y meta exo) y como era de esperar predicen una mayor estabilidad para los estados de transición endo.

A partir de estos estudios se diseñó el correspondiente hapteno teniendo en cuenta que este debería mimetizar algunas de las características importantes del estado de transición. El anticuerpo generado mediante la administración del hapteno diseñado ha de ser capaz de reconocer y estabilizar sólo uno de los cuatro posibles estados de transición. Los haptenos fueron sintetizados y cristalizados y su estructura cristalina fue comparada con la estructura calculada del estado de transición correspondiente, observándose una similitud estructural apreciable. (Figura 3)

La utilización de estos haptenos así diseñados permitió el desarrollo de los anticuerpos capaces de catalizar esta reacción y obtener de forma selectiva no solo el producto de adición favorecida, producto endo, sino también el producto desfavorecida, producto exo(10).



C3-C4-C5-C6: 1.1°

C3-C4-C5-C6: 0.7°

C2-C3: 2.35 Å

C2-C3: 1.55 Å

C6-C1: 2.05 Å

C6-C1: 1.55 Å

Figura 3.- Comparación entre las geometrías del estado de transición de la orto-endo (izquierda) con la estructura cristalina del hapteno diseñado para mimetizarlo (derecha).

Años más tarde el estudio de Xu(11) de 1999 constituyó un nuevo avance en la ampliación del campo de utilidad de los anticuerpos catalíticos. Utilizando técnicas de rayos X y computacionales avanzadas pudieron estudiar la evolución de la complementariedad –ya que la unión antígeno-anticuerpo no es algo estático, sino dinámico- entre las moléculas, y extraer conclusiones acerca de cómo debe ser el hapteno que genere el anticuerpo que catalice, por ejemplo, cicloadiciones tipo Diels-Alder. (Figura 4, código pdb=1c1e)

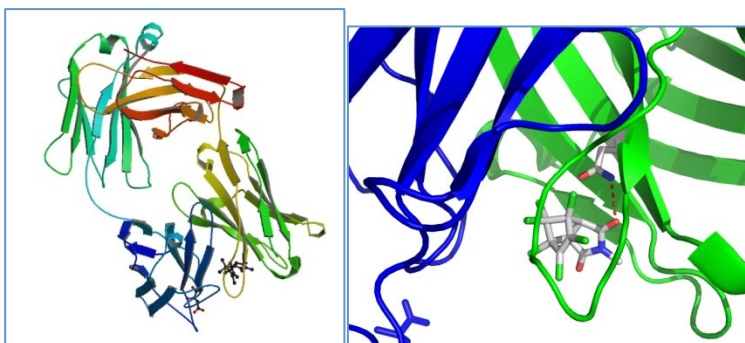


Figura4.- Estructura cristalina de la Diels-Alderasa en complejo con un hapteno.

Quizá aquello que se afirmaba en 1996 sobre el diseño de haptenos “es todavía más un arte que una ciencia”(12) se ha quedado ya obsoleto, derivando hacia lo que puede ser el empujón definitivo al avance decidido en este campo del conocimiento.

Además, estos estudios iniciales, sobre los anticuerpos catalíticos han derivado hacia un campo apasionante como son las theozymes (*theoreticalenzymes*), permitiendo diseñar de forma teórica la enzima necesaria para catalizar un determinado proceso(13).

3. MECÁNICA MOLECULAR

Las técnicas de mecánica molecular se basan en un modelo simplificado de las moléculas, entendidas como un sistema clásico de masas (los núcleos atómicos)

conectadas por unos resortes (los enlaces formados por los electrones) que verifican la ley de elasticidad de Hooke. Frecuentemente esta simplificación es a menudo comparada como un sistema de bolas y muelles. Esta analogía responde a las siguientes características: cada bola encierra las propiedades de un átomo, propiedades que dependen en realidad de su distribución electrónica. En la mecánica molecular, en lugar de calcular la función de onda en cada sistema, se estima el valor de las propiedades derivadas de esta a través de una serie de parámetros. La primera consideración es definir un conjunto de tipos de átomos, cada uno de los cuales viene determinado no sólo por el elemento a que se refiere (oxígeno, carbono...) sino por los diferentes estados en que este se puede encontrar en un sistema molecular (carbono con hibridación sp^2 , carbono con hibridación sp^3 ...).

Una vez definido el conjunto de átomos, el efecto de la distribución electrónica se puede aproximar a través de la inclusión de una serie de cargas parciales (*partialcharges*) para cada átomo. Estas cargas se habrán de definir para cada molécula con la que se trabaja, puesto que dependen no solo del tipo de átomo sino del entorno molecular. El método de cálculo de carga parcial varía desde aproximaciones topológicas, como las cargas de Gasteiger-Marsili,(14) a métodos teóricamente más exactos, como el *restrainedelectrostaticpotentialfitting* (RESP)(15) empleado para definir las cargas parciales mediante un ajuste que pretende reproducir lo mejor posible la distribución del potencial electrostático molecular, calculada ab initio con una base 6-31G*. Existen otros métodos intermedios, como por ejemplo los basados en el análisis de Mulliken de la distribución electrónica sobre el hamiltoniano AM1. Es común el empleo de los métodos de cálculo de cargas rápidos (Gasteiger, AM1) en los estudios de docking, mientras que procedimientos más elaborados como el RESP se reservan para estudios de dinámica molecular o para el cálculo de energía libre de unión. Las cargas parciales son necesarias para calcular interacciones de tipo electrostático que se dan entre dos átomos i y j que no están enlazados, a través del término de interacción culómbica:

$$V_{el(i,j)} = -\frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad 4)$$

siendo q la carga parcial de cada átomo, r la distancia que los separa y ϵ la constante dieléctrica del medio, que representa la oposición del entorno (agua y proteína) a la interacción entre ambas cargas. El valor de esta constante es de $\epsilon = 80$ para el agua, mientras que los valores típicos de proteínas son mucho menores (entre 2 y 5). Sin embargo, pueden existir microentornos proteicos más polares donde el valor de ϵ se incrementa. Se puede afirmar que el uso de esta constante pretende incorporar todos aquellos efectos que no han sido explícitamente

considerados en el modelo (como el solvente acuoso o la membrana celular), tomando valor unidad cuando todos estos efectos se consideran de manera explícita. La optimización de su valor en cálculos referidos a proteínas es motivo de continuas revisiones. Una aproximación generalizada es asignar valores de e dependientes de la distancia r_{ij} .

Es necesario tener en cuenta los términos de repulsión y atracción de la función de van der Waals, la cual evalúa la interacción no electrostática entre pares de átomos no enlazados. Estos términos vienen representados por las constantes A y B .

$$V_{vdW(i,j)} = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (5)$$

Estos valores se obtienen empíricamente para cada tipo de átomo interaccionando consigo mismo (A_{ij} y B_{ij}). Los valores para cada par ij se obtienen mediante la media geométrica $A_{ij} = \sqrt{A_{ij} \cdot A_{ji}}$ (y de manera análoga para B). La formulación de la ecuación 5 recibe el nombre de potencial de Lennard-Jones aunque existen otras formas alternativas de formular la función de van der Waals, basándose en variaciones en el valor de los exponentes de los términos r_{ij} .

Los términos electrostático (V_{el}) y de van der Waals (V_{vdW}) se calculan para cada par de átomos no enlazados que se encuentren a una distancia r menor que una distancia de corte $r_{cut-off}$. Esta aproximación se utiliza para ahorrar tiempo de cálculo, ya que si no, habría que evaluar N^2 interacciones (siendo N el número de átomos del sistema). Es posible evaluar la interacción electrostática cuando $r > r_{cut-off}$ en un tiempo razonable de tiempo, como por ejemplo mediante el método *local reactionfield*.(16)

Se asume que los enlaces entre átomos son flexibles alrededor de unas distancias de equilibrio (r_0), de forma que pueden vibrar como lo hace un muelle. Esta vibración se representa mediante un potencial armónico cuadrático del tipo:

$$V_{enlace} = k_r (r - r_0)^2 \quad (6)$$

Este potencial cumple estrictamente la ley de Hooke. k_r es una constante de fuerza definida para cada par de tipos de átomo (ij) que puedan estar enlazados, y r_0 la distancia de equilibrio del enlace ij .

De forma análoga, el ángulo q que forma cada par de enlaces contiguo también puede variar alrededor de un valor de equilibrio q_0 , siendo la constante de fuerza k_q :

$$V_{ángulo} = k_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

7)

Los ángulos torsionales ϕ (que definen la rotación sobre los enlaces) varían de forma distinta, ya que dicha rotación ha de pasar una barrera periódica. Por tanto, su variación se modela a través de una función periódica del tipo:

$$V_{torsión} = \frac{1}{2} k_n (1 + \cos(n\phi - \gamma)) \quad 8)$$

siendo k_n la barrera de rotación, n la periodicidad (número de veces que aparece la barrera en un giro completo) y γ la fase (la localización de la primera barrera).

Adicionalmente se pueden modelar los enlaces de hidrógeno de forma específica, a través de un potencial análogo al de Lennard-Jones con modificaciones de los parámetros. Esta consideración explícita de los enlaces de hidrógeno aparecía en la primera versión del campo de fuerzas del programa AMBER,(17), por ejemplo. En otros programas, su efecto ya está incluido indirectamente en los términos electrostático y de van der Waals. También hay que considerar los llamados ángulos torsionales impropios, que se refieren a la planaridad de un sistema de cuatro átomos en los cuales uno de ellos, en posición central, está enlazado a los otros tres (por ejemplo en anillos tipo naftaleno). Estos pueden ser modelados de forma análoga a los ángulos torsionales a través de potenciales periódicos, como sucede en CHARMM,(18) GROMOS(19) y AMBER(17) o bien a través de potenciales harmónicos. Por último, existe la posibilidad de simplificar la representación molecular mediante los modelos *unitedatom*, que no consideran explícitamente los hidrógenos no polares, de forma que sus características (masa, carga) se añaden al átomo al que estén unidos(20). Esta aproximación se usa en los programas GROMOS, GRID y AutoDock.

El sumatorio de los términos formulados en las ecuaciones anteriores da lugar a la expresión de la energía potencial de un sistema molecular:

$$V_{p\alpha} = \sum_{enlace} V_{enlace} + \sum_{ángulos} V_{ángulo} + \sum_{torsionales} V_{torsion} + \sum_{r < r_{cut-off}} (V_{el} + V_{vdW}) \quad 9)$$

El modo de formular cada uno de los términos comentados anteriormente, el método de obtención de cargas parciales y parámetros Lennard-Jones, el número de tipos de átomos (*atomtypes*) y el conjunto de parámetros (constantes k y valores de equilibrio en cada ecuación) constituye lo que se denomina un campo de fuerzas de mecánica molecular (*force-field*).

Existen numerosos *campos de fuerza* como MM2, Amber, POLS, CVFF, GROMOS o CHARMM, entre otros. Sin embargo, mencionaremos de forma especial CHARMM porque la contribución de los galardonados al desarrollo de este

programa ha sido fundamental. Los trabajos conducentes al desarrollo de este campo de fuerzas, están basados en uno inicialmente desarrollado por Lifson y Arieh Warshel, denominado Consistent Force Field (CFF), que incluía interacciones no enlazantes.(21) También fueron fundamentales los trabajos pioneros de Michael Levitt en el cálculo de energías de proteínas, (22) así como los trabajos de Harold Scheraga.(23)

Inicialmente se le dio el nombre de **HARMM** (**HAR**vard**MAC**romolecular **Mechanics**), sin embargo, debido a que su significado en inglés no resultaba muy atractivo, se introdujo el término Chemistry, resultando con el nombre con el que actualmente se conoce **CHARMM** (**CHEM**istry**HAR**vard**MAC**romolecular **Mechanics**)(18).

3.1. Dinámica Molecular

En la dinámica molecular (Molecular Dynamics, MD) se generan las conformaciones sucesivas del sistema integrando las leyes de Newton del movimiento. El resultado es una trayectoria en la que las posiciones y las velocidades de los átomos del sistema varían a lo largo del tiempo de simulación. La trayectoria del sistema se obtiene resolviendo la segunda derivada de la Segunda Ley de Newton. $F=ma$:

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (10)$$

Esta describe el movimiento de un átomo de masa m_i a lo largo de las coordenadas (x_i) con una fuerza determinada (F_i) que viene dada por el campo de fuerzas, y un tiempo t . En el punto inicial de la dinámica, la energía total del sistema es la suma de las energías cinética y potencial para las coordenadas (x_0) y velocidades (v_0) iniciales:

$$E_{tot} = E_{pot}(x_0) + E_k(v_0) \quad (11)$$

Este es un método determinista ya que el resultado final es dependiente de la posición inicial de los átomos del sistema (de ahí la recomendación de partir de varias conformaciones iniciales para comprobar que los resultados convergen, así como la necesidad de realizar una minimización previa para evitar que haya gradientes de energía muy grandes que distorsionen el comportamiento del sistema).

La evolución del sistema a lo largo del tiempo se obtendrá mediante integración numérica. Esta integración se realizará en fracciones de tiempo

separadas por el valor de dt . La fuerza total de cada partícula en el tiempo t (que se asume que es constante) se calcula como la suma vectorial de las interacciones con los demás átomos y se determina mediante la derivada de la energía potencial con respecto a las coordenadas:

$$F = -\partial E_{pot} / \partial x \quad 10)$$

A partir de las fuerzas se puede determinar la aceleración de los átomos de modo que, conociendo sus posiciones y velocidades a tiempo t , podemos calcular sus posiciones y velocidades en la siguiente fracción de tiempo, $t+dt$.

Este proceso se repite sucesivamente para generar la trayectoria completa para todos los átomos del sistema.

Los algoritmos empleados en MD para generar las trayectorias asumen que las propiedades de estas se pueden aproximar mediante series de Taylor:

$$\begin{aligned} x_i(t + \partial t) &= x_i(t) + \partial t v_i(t) + \frac{1}{2} \partial t^2 a_i(t) + \dots \\ v_i(t + \partial t) &= v_i(t) + \partial t a_i(t) + \frac{1}{2} \partial t^2 b_i(t) + \dots \\ a_i(t + \partial t) &= a_i(t) + \partial t b_i(t) + \frac{1}{2} \partial t^2 c_i(t) + \dots \end{aligned} \quad 11)$$

donde v es la velocidad (primera derivada de las posiciones con respecto al tiempo), a es la aceleración (segunda derivada), c es la tercera derivada, etc.

Estas ecuaciones se integran mediante el algoritmo de Verlet(24), que usa las posiciones y aceleraciones a tiempo t y las posiciones en la etapa previa, $x(t-dt)$, para calcular las nuevas posiciones a $t+dt$, $x(t+d)$.

El tiempo de integración dt elegido es de vital importancia ya que si es demasiado pequeño la trayectoria apenas cubrirá una parte de todo el espacio conformacional, mientras que si es demasiado grande puede provocar inestabilidades debidas a solapamientos energéticos entre átomos. Los movimientos de mayor frecuencia son aquellos que corresponden a la vibración de los enlaces con hidrógenos. Se sabe que estas vibraciones ocurren en la escala del femtosegundo (fs) y su inclusión en el cálculo no haría más que añadir una carga computacional extra innecesaria ya que no influyen en el movimiento global del

sistema. Es por ello que se suele fijar la longitud de los enlaces covalentes a sus valores de equilibrio mediante el algoritmo SHAKE(25). De esta forma se aumenta el tiempo de integración a 2 fs y se acelera la velocidad del cálculo.

La dinámica molecular permite, entre otras aplicaciones dentro del campo de la química:

- Predecir estructuras y propiedades de proteínas que se diferencian sólo en unos pocos aminoácidos.
- Refinar un modelo resuelto por homología.
- Estudiar la estabilidad de una proteína frente a variaciones de pH, temperatura o disolvente.
- Estudiar cambios conformacionales asociados con las propiedades catalíticas de una enzima (estabilización de un estado de transición).
- Estudiar las aperturas y cierres de sitios activos de biomoléculas.
- Estudiar la estabilidad del modo de unión de un ligando a una proteína.
- Estudiar selectividad y afinidad de un ligando por una proteína.

3.2. La primera dinámica molecular de una biomolécula

Si las aplicaciones de la química cuántica son numerosísimas, el uso de la mecánica molecular es quizás aún mayor en todos los campos de la química.

Una vez más los galardonados fueron pioneros en la utilización de esta metodología para el estudio de sistemas biológicos. Así, seleccionaron la BPTI (Inhibidor de la tripsina pancreática bovina) para llevar a cabo la que se considera la primera simulación de dinámica molecular de una biomolécula.

Seleccionaron esta proteína por ser de pequeño tamaño, poseer una estabilidad relativa bastante razonable y porque se disponía en ese momento de una estructura cristalina con buena resolución (1.5 Å), disponible(26).

Esta dinámica duró tan sólo 9.2 ps, sin embargo fue fundamental para reemplazar la visión generalizada de las proteínas como estructuras rígidas(27).

4. QM/MM

Para el modelado de reacciones enzimáticas y otros procesos biomoleculares que involucran cambios en la estructura electrónica, como ruptura y formación de enlaces, transferencia de carga o excitación electrónica, la metodología mixta QM/MM se ha convertido en el método de elección.

El trabajo pionero en esta área se debe a Warshel y Levitt.(1) En este trabajo, los investigadores presentaban por primera vez la combinación de ambos métodos para describir la formación de un intermedio de tipo ión carbonio en el sitio activo de la lisozima.

Esta técnica permite combinar potenciales de la mecánica cuántica (QM) y de la mecánica molecular (MM) en un potencial híbrido QM/MM.

Permite combinar la simplicidad y velocidad del tratamiento MM con el potencial de la QM que permite el estudio de la formación y ruptura de enlaces, así como la inclusión de la polarización electrónica debida al medio. Este tipo de aproximación nos va a permitir el estudio de reacciones químicas en el seno de grandes sistemas ya que las regiones del sistema implicados en la reacción se analizan mediante una función QM mientras que el potencial de los demás átomos del sistema se examina por cálculos clásicos de MM en los que las interacciones atómicas están regidas por el campo de fuerzas.

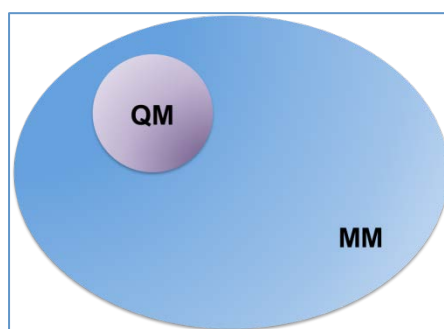


Figura 5. Representación de la división de un sistema molecular en zona QM y zona MM.

La energía total (E_{tot}) para este tipo de sistemas se puede escribir de la siguiente forma:

$$E_{tot} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM}$$

donde E_{QM} y E_{MM} corresponden a la energía de aquellas partes del sistema tratadas exclusivamente con mecánica cuántica y mecánica molecular, respectivamente. Mientras que $E_{QM/MM}$ es la energía de interacción entre las partes mecánicocuánticas y mecánico-moleculares.

Los átomos de la región QM se representan como electrones y núcleos. El Hamiltoniano asociado a esta región, en la aproximación de Born-Oppenheimer.

$$H_{QM} = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_{ij} \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{i\alpha} \frac{Z_\alpha}{r_{i\alpha}} + \sum_{\alpha\beta} \frac{Z_\alpha Z_\beta}{R_{\alpha\beta}}$$

donde i y j representan las coordenadas electrónicas, α y β las coordenadas nucleares, r la distancia electrón-electrón o electrón-núcleo, R las distancia núcleo-núcleo, ∇ es el operador de energía cinética electrónica y Z es la carga nuclear.

La zona MM contiene el resto de los átomos del sistema. Estos se describen clásicamente, y sus interacciones se determinan mediante funciones de energía potencial empíricas, de modo que dichos átomos no pueden estar implicados en procesos de formación o ruptura de enlaces, ni de transferencia de carga. La energía de la región MM depende inicialmente de las posiciones de los átomos o centros tratados mediante mecánica molecular, si ignoramos la polarización de este subsistema:

$$E_{MM} = E_{\text{enlace}} + E_{\text{no enlace}}$$

$$E_{\text{enlace}} = E_{\text{enlaces}} + E_{\text{ángulos}} + E_{\text{diedros}}$$

$$E_{\text{no enlace}} = E_{\text{electrostática}} + E_{\text{van del Waals}}$$

Por último, el término $E_{QM/MM}$ describe cómo interaccionan los átomos QM con los centros MM. El Hamiltoniano, en unidades atómicas, viene dado por la siguiente ecuación

$$H_{QM/MM} = - \sum_{iM} \frac{q_M}{r_{iM}} + \sum_{\alpha M} \frac{Z_{\alpha} q_M}{R_{\alpha M}} + \sum \left\{ \frac{A_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^{12}} - \frac{B_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^6} \right\}$$

donde los subíndices ij hacen referencia a los electrones de los átomos QM, los subíndices α a los núcleos de los átomos QM y los subíndices M a los átomos MM. El primer término de la ecuación representa las interacciones electrostáticas entre los átomos MM y los electrones de los átomos QM. El segundo término representa las interacciones electrostáticas entre los átomos MM y los núcleos de los átomos QM, y el tercer término describe interacciones de van der Waals entre centros QM y MM. Los dos últimos términos de esta ecuación no incluyen coordenadas electrónicas, de modo que pueden ser calculados y sumados directamente a la energía total. Sin embargo, el primer término sí que incluye coordenadas electrónicas por lo que debe tratarse en el procedimiento autoconsistente.

Se han implementado distintos métodos con el fin de estudiar un sistema mediante QM/MM. Estos difieren entre sí (i) por el nivel de teoría utilizado para la mecánica cuántica (semiempírico, *ab initio*, enlace de valencia o funcional de densidad), (ii) por el modelo de mecánica molecular empleado o (iii) por el modo de representar el disolvente (disolvente explícito o modelo simplificado).

Un punto importante, y que también constituye una diferencia entre métodos QM/MM, es el modo de tratar la unión entre las dos regiones. En general,

es preferible cortar enlaces no polares (como enlaces sencillos C-C) que cortar enlaces insaturados o polares.

La partición del sistema en subsistemas QM y MM resulta especialmente problemática cuando la división tiene lugar, necesariamente, a través de la ruptura de un enlace covalente entre ambos subsistemas (Figura 6). En estos casos hay que recurrir a algún tipo de aproximación que permita satisfacer las valencias de los átomos cuánticos que definen el enlace entre la región cuántica y la región clásica por donde se producirá la división.

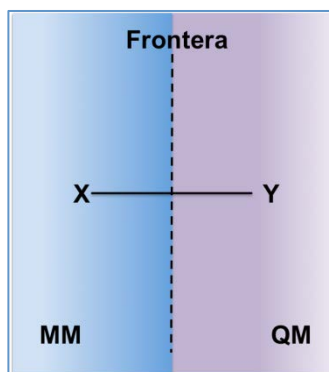


Figura 6. Representación esquemática de la división de un sistema molecular en subsistemas en los métodos QM/MM cuando la frontera corta necesariamente un enlace covalente.

Actualmente existen varias aproximaciones para resolver este problema. En una primera aproximación, se establece un orbital híbrido sp^2 que contiene un electrón a lo largo de la región QM/MM(1).

La opción más popular es, probablemente, el uso de átomos de unión “link atoms”: en este métodos se saturan las valencias de los átomos QM pertenecientes al enlace fluctuante con un átomo QM más, normalmente hidrógeno, convenientemente parametrizado, que asegura la conservación de la valencia. Este átomo se describe a nivel QM y es invisible para los átomos MM, porque no se tienen en cuenta las interacciones entre el átomo de unión y los átomos del subsistema clásico(28).

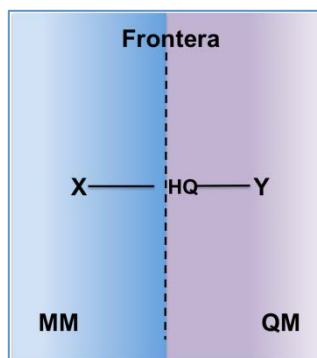


Figura 7.- Representación esquemática de la aproximación del “link atom” para el tratamiento de los átomos frontera en los métodos QM/MM.

Otro método es el denominado LSCF (Local Self consistent Field), basado en el formalismo del campo local auto-consistente, donde los enlaces QM/MM frontera son descritos mediante orbitales de enlace localizados. Estos orbitales, llamados orbitales congelados, son excluidos del cálculo SCF y se encuentran definidos por sus coeficientes de hibridación y por su población electrónica. Estos dos parámetros son determinados mediante cálculos QM sobre sistemas pequeños y se supone que estos resultados son transferibles a los sistemas de interés. Este método es más ajustado desde el punto de vista teórico, pero más complejo de implementar.

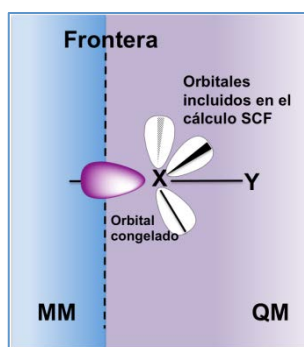


Figura 8.- Representación esquemática de la aproximación LSCF para los átomos frontera en los métodos QM/MM.

El método GHO (GeneralizedHybrid Orbital), hace uso del orbital atómico híbrido, similar al método anterior LSCF, pero en este caso los orbitales pueden dividirse en orbitales auxiliares y orbitales activos. Estos últimos se optimizan junto con el resto de orbitales de la región QM en el cálculo SCF, mientras que la unión entre el átomo frontera y la región MM se define mediante los campos de fuerza MM. A diferencia del método LSCF, el método GHO no necesita de un proceso de parametrización cada vez que se estudia un nuevo sistema.

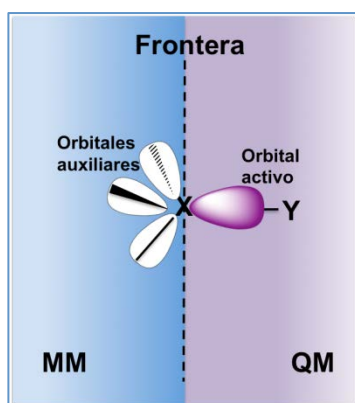


Figura 9.- Representación esquemática de la aproximación GHO para los átomos frontera.

En general se recomienda que, en el caso de ser necesario, la partición entre el sistema QM y MM esté lo más alejada posible de los átomos implicados directamente en la reacción. De esta manera se evita que las aproximaciones utilizadas en las metodologías influyan sobre el resultado final.

Existen numerosos programas que permiten realizar este tipo de cálculos, uno de los más utilizados es el programa **ONIOM** (**O**urown**N**-Layered**I**ntegrated molecular **O**rbital and molecular **M**echanics), que en su nombre hace alusión precisamente a la construcción en capas, como la cebolla. El desarrollo de las primeras versiones de este programa se debe a un Español, Feliu Masera, que la Academia Sueca de Ciencias menciona en su comunicado tras la concesión del Premio Nobel de este año(29).

4.1. La primera simulación QM/MM aplicada a una enzima

Una vez más los galardonados fueron pioneros en la utilización de esta metodología para el estudio de sistemas biológicos. Consideraron que el estudio detallado del mecanismo de una reacción enzimática era un problema importante.

Seleccionaron para este primer estudio la lisozima, una conocida enzima, sobre la que se habían realizado ya numerosos estudios sobre su posible mecanismo de reacción(30) y había diversas estructuras tridimensionales del complejo entre la lisozima y un inhibidor tri-N-acetyl glucosamina (*tri*-NAG) y en el modelo de hexa-NAG, sustrato natural dentro del sitio activo de la enzima(31).

En concreto estudiaron la estabilidad del ion carbonio intermedio formado en la ruptura por la lisozima de un enlace glucosídico. Se encontró que la estabilización electrostática constituía un factor importante que podría justificar el incremento en la velocidad de la reacción que conduce a la formación de este intermedio. Los factores estéricos, tales como la tensión del sustrato al unirse a la lisozima, no parecen contribuir significativamente.

El método descrito en este trabajo considera todo el sistema enzima-sustrato. La energía y la distribución de carga de los átomos directamente involucrados en la reacción se evaluaron mediante química cuántica, mientras que la superficie de energía potencial del resto del sistema, incluyendo el disolvente se evaluó con métodos clásicos. Un detalle importante del método es que el tratamiento del efecto dieléctrico debido tanto a los átomos de la proteína, como al disolvente (agua). Su modelo dieléctrico se basó en un cálculo directo del campo electrostático debido a los dipolos inducidos al polarizar los átomos de la proteína y los dipolos inducidos al orientar las moléculas de agua del entorno(1).

4.2. Otras aplicaciones de QM/MM

Durante mucho tiempo los cálculos QM/MM estuvieron dominados por el estudio de reactividad enzimática. Sin lugar a duda este es uno de los principales campos de aplicación, pero no sólo la formación y ruptura de enlaces requiere QM/MM, sino también otros procesos asociados a reorganización de la estructura electrónica. Por ejemplo las propiedades espectroscópicas.

Refinamiento de estructuras.

Una aplicación especialmente interesante es su combinación con datos experimentales como el refinamiento de la estructura. Una técnica prometedora utilizada por primera vez por Ryde y colaboradores(32) aplica el método QM/MM para refinar los datos estructurales a partir de un solo cristal de difracción de rayos X(33) , RMN(34) o EXAFS(35). La idea básica es usar un QM/MM, en lugar de sólo MM, y el modelo obtenido se refina teniendo en cuenta los datos experimentales. Esta aplicación alivia el problema que surge con la fiabilidad de los datos experimentales alrededor del sitio activo, porque los métodos MM han sido cuidadosamente desarrollados para describir las proteínas, pero son menos fiables para los sustratos o cofactores.

Reactividad

Las reacciones enzimáticas han sido el objetivo principal de los métodos QM/MM.

Dentro de la gran variedad de sistemas estudiados uno de los más representativos es el de la corismatomutasa.

La corismatomutasa es una enzima que cataliza la transposición de Claisen de corismato a prefenato (Figura 10), un paso clave en la vía del ácido siquímico que da lugar a la síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, hongos y bacterias. Esta reacción constituye un raro ejemplo de una reacción pericíclica en un sistema biológico y ha sido el objeto de numerosos estudios teóricos.

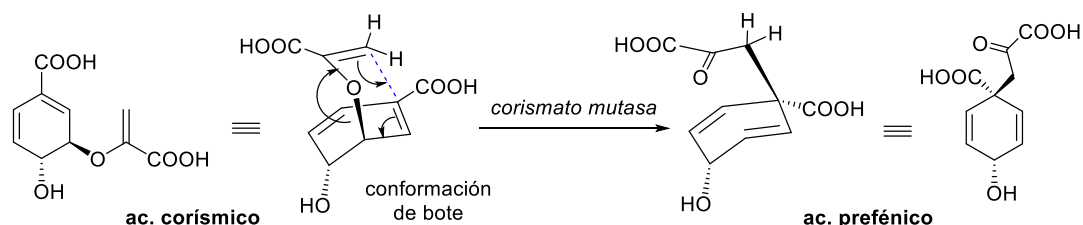


Figura 10.-Reordenamiento de claisen de ácido corísmico a prefénico por medio de la corismatomutasa.

Lyne, Mulholland y Richards publicaron en 1995 el primer estudio QM/MM (AM1/CHARMM) de la corismatomutasa(36). Optimizaron la estructura del reactivo y el perfil de la reacción e identificaron residuos esenciales dentro del sitio activo de la enzima. Observaron que el complejo enzima sustrato está distorsionado comparado con los cálculos previos en fase gaseosa, pareciéndose más al estado de transición, de forma que un residuo de arginina y otro de glutámico estabilizan esta disposición. Llegaron a la conclusión de que la estabilización electrostática del estado de transición es la contribución más importante al proceso de catálisis, en este caso.

Un gran número de estudios posteriores,(37) incluyendo trabajos de Warshel,(38) utilizando diferentes métodos y aproximaciones de cálculo han permitido confirmar esta primera hipótesis.

5. CONCLUSIÓN

En este trabajo he pretendido resumir los hallazgos más importantes que han conducido a la concesión del Premio Nobel de Química en 2013, al haber sido pioneros el desarrollo y utilización de diversos métodos computacionales basados tanto en la mecánica cuántica, como en la mecánica clásica con el fin de desvelar, al nivel de detalle atómico, numerosos misterios acerca de cómo funcionan las biomoléculas y sobre todo por haber sido los primeros en combinar ambos métodos permitiendo un estudio más detallado y preciso de estos procesos químicos complejos.

Recomiendo al lector la lectura detallada del artículo autobiográfico escrito por uno de los galardonados, Martin Karplus (6), titulado "Spinach on the Ceiling: A theoretical Chemist's Return to Biology", donde describe las experiencias que le condujeron desde la química y la física de nuevo a su "primer amor", la biología y en el que describe algunas de las contribuciones realizadas durante su trayectoria investigadora. En esta trayectoria sus trabajos se cruzan con frecuencia con los de los otros investigadores galardonados con el Premio Nobel de este año.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Warshel, A., and Levitt, M. (1976) Theoretical Studies of Enzymic Reactions: Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium ion in the Reaction of Lysozyme. *J. Mol. Biol.* 103: 227-249.
2. Gaussian 98 (Revision A.7), M. J. F., G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, , T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998.
3. Schmidt, M. W., Baldridge, K. K., Boatz, J. A., Elbert, S. T., Gordon, M. S., Jensen, J. H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K. A., Su, S., Windus, T. L., Dupuis, M., and Montgomery Jr, J. A. (1993) General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comp. Chem.* 14: 1347-1363.
4. Dewar, M. J. S., and Thiel, W. (1977) Ground states of molecules. 39. MNDO results for molecules containing hydrogen, carbon, nitrogen, and oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 99: 4907-4917.
5. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., and Stewart, J. J. P. (1985) Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 3902-3909.
6. Karplus, M. (2006) Spinach on the Ceiling: A theoretical Chemist's Return to Biology. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35: 1-47.

7. Honig, B., and Karplus, M. (1971) Implications of torsional potential of retinal isomers for visual excitation. *Nature*. 229: 558-560.
8. Gilardi, R., Karle, I., Karle, J., and Sperling, W. (1971) Crystal structure of visual chromophores, 11-cis and all-trans retinal. *Nature*. 232: 187.
9. González, D., García, M. A., and de Pascual-Teresa, B. (2000) Anticuerpos Catalíticos: Aplicaciones Químicas y Farmacológicas. . *Industria Farmacéutica*. Noviembre-Diciembre: 111-120.
10. Gouverneur, V. E., Houk, K. N., de Pascual-Teresa, B., Beno, B., Janda, K. D., and Lerner, R. A. (1993) Control of the Exo-pathway and Endo-pathway of the Diels-Alder Reaction by Antibody Catalysis. *Science*. 262: 204-208.
11. Xu, J., Deng, Q., Chen, J., Houk, K. N., Bartek, J., Hilvert, D., and Wilson, I. (1999) Evolution of shape complementarity and catalytic efficiency from a primordial antibody template. *Science*. 286: 2345 - 2348.
12. Kirby, A. J. (1996) The potential of catalytic antibodies. *Acta Chem. Scand*. 50: 203-210.
13. Kiss, G., Olcum, N., Moretti, R., Baker, D., and Houk, K. (2013) Computational Enzyme Design. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52: 5700-5725.
14. Gasteiger, J., and Marsili, M. (1978) A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Lett.* 19: 3181-3184.
15. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., and Kollman, P. A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* 97: 10269-10280.
16. Lee, F. S., and Warshel, A. (1992) A local reaction field method for fast evaluation of long-range electrostatic interactions in molecular simulations. *J. Phys. Chem.* 97: 3100-3107.
17. Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., and Woods, R. J. (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comp. Chem.* 26: 1668-1688.
18. Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem.* 4: 187-217.
19. Hermans, J., Berendsen, H. J. C., van Gusteren, W. F., and Postma, J. P. M. (1984) A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers*. 23: 1513-1518.
20. Kini, R. M., and Evans, H. J. (1992) Comparison of protein models minimized by the all-atom and united-atom models in the AMBER force field: correlation of RMS deviation with the crystallographic R factor and size. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 10: 265-279.
21. Lifson, S., and Warshel, A. (1969) Consistent force field for calculations of conformations vibrational spectra and enthalpies of cycloalkanes and n-alkane molecules. *J. Chem. Phys.* 49: 116-129.
22. Levitt, M., and Lifson, S. (1969) Refinement of Protein Conformations Using a Macromolecular Energy Minimization Procedure. *J. Mol. Biol.* 46: 269-&.
23. Scheraga, H. (1968) Calculations of the conformations of small molecules. *Adv. Phys. Org. Chem.*: 103-184.
24. Schiff, D., and Verlet, L. (1967) Ground State of Liquid Helium-4 and Helium-3. *Physical Review*. 160: 208-&.
25. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a system with Constraints-Molecular-Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* 23: 327-341.
26. *Buscar*. (1975). *Acta crystallographica B*. 31: 238-250.
27. McCammon, J., Gelin, B., and Karplus, M. (1977) Dynamics of folded proteins. *Nature*. 267: 585-590.
28. Senn, H. M., and Thiel, W. (2009) QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48: 1198-1229.
29. Maseras, F., and Morokuma, K. (1995) IMOMM - A new integrated ab initio + molecular mechanics geometry optimization scheme of equilibrium structures and transition states. *J. Comp. Chem.* 16: 1170-1179.
30. Levitt, M. (1974) energy Refinement of Hen Egg-White Lysozyme. *J. Mol. Biol.* 82: 393-420.
31. Blake, C. C. F., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., and Sarma, V. R. (1967) Crystallographic Studies of Activity of Hen Egg-White Lysozyme. *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences*. 167: 378-+.

32. Ryde, U., Olsen, L., and Nilsson, K. (2002) Quantum chemical geometry optimizations in proteins using crystallographic raw data. *J. Comp. Chem.* 23: 1058-1070.
33. Rulisek, L., and Ryde, U. (2006) Structure of reduced and oxidized manganese superoxide dismutase: a combined computational and experimental approach. *Journal of Physical Chemistry B.* 110: 11511-11518.
34. Hsiao, Y.-W., Drakenberg, T., and Ryde, U. (2005) NMR structure determination of proteins supplemented by quantum chemical calculations: detailed structure of the Ca²⁺ sites in the EGF34 fragment of protein S. *J. Biomol. NMR.* 31: 97-114.
35. Hsiao, Y.-W., and Ryde, U. (2006) Interpretation of EXAFS spectra for sitting-atop complexes with the help of computational methods. *Inorganica Chimica Acta.* 359: 1081-1092.
36. Lyne, P. D., Mulholland, A. J., and Richards, W. G. (1995) Insights into Chorismate Mutase Catalysis from Combined QM/MM Simulations of the Enzyme Reaction *J. Am. Chem. Soc.* 117
37. Claeysens, F., Ranaghan, K. E., Manby, F. R., Harvey, J. N., and Mulholland, A. J. (2005) Multiple high-level QM/MM reaction paths demonstrate transition-state stabilization in chorismate mutase: correlation of barrier height with transition-state stabilization. *Chem. Commun.:* 5068-5070.
38. Strajbl, M., Shurki, A., Kato, M., and Warshel, A. (2003) Apparent NAC effect in chorismate mutase reflects electrostatic transition state stabilization. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 10228-10237.

La dignidad de la persona mayor



José Manuel Ribera Casado

Catedrático Emérito de Geriatría. Facultad de Medicina. U. Complutense.
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina.
Conferencia pronunciada en la Real Academia Nacional de Farmacia (7.V.2014).

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 2 (2014), pag.433-443.

“La dignidad está por encima de cualquier precio y, por lo tanto, no tiene equivalente” (E. Kant)

¿De qué estamos hablando? Lo de la persona mayor parece bastante claro. No tanto lo de la dignidad. Como ocurre casi siempre que nos referimos a lo que llamamos “valores” resulta muy difícil establecer una buena definición de lo que entendemos por dignidad. En el diccionario de la Real Academia y en el Espasa se le asignan entre otras acepciones las de excelencia, realce o, aplicado a un individuo o a un colectivo, se habla de poseer la calidad de digno, entendiendo como tal a la persona o grupo que es merecedora de ello. En el diccionario de filosofía de Ferrater Mora simplemente no aparece el término. Donde más detenidamente se interpreta la palabra “digno” es en el Diccionario del Uso del Español de María Moliner. Lo hace asociado a más de una decena de sinónimos y a varias acepciones. Entre ellas una que considero muy adecuada: “se aplica al que obra, habla, se comporta, etc. de manera que merece el respeto y la estimación de los demás y de sí mismo”. El término respeto y el muy próximo de autoestima considero que se ajustan bien a lo que entendemos por dignidad de la persona mayor.

En el lenguaje diario y en el sentir general asociamos el ser humano a la idea de dignidad. Esto no siempre ha sido así. Como bien señala el filósofo Ramón Valls (1) en origen era un concepto que distinguía y jerarquizaba. Afectaba a quienes por su excelencia sobresalían por encima de otros. Era cosa de algunos. La dignidad moderna es de todos. Es universal porque no se considera consecuencia de un buen comportamiento sino como principio de él. Todos somos dignos, al menos desde Kant y la Ilustración. De forma específica desde que en 1948 el artículo 1 de la Declaración Universal de Derechos Humanos señalase que “todos los seres humanos nacen libres e iguales en dignidad y derechos”. Todos somos

dignos, con independencia de nuestras características personales, como raza, edad, salud o cualquier otro elemento diferenciador. El artículo 10.1 de la Constitución Española insiste en lo mismo al remarcar que “la dignidad de la persona, los derechos inviolables que le son inherentes ... son fundamento del orden político y de la paz social”. Equipara dignidad e igualdad, la considera un derecho y excluye de forma explícita cualquier forma de discriminación. Hasta aquí un resumen de lo que podemos considerar la teoría.

Entiendo que el planteamiento que se hace al proponerme este título tiene que ver con la posibilidad –y el riesgo- de que los cambios que tienen lugar en el tiempo vinculados al proceso de envejecer determinen por sí mismos algún tipo de metamorfosis que pudiera comprometer o menoscabar esta condición de digno. O bien que la forma de valorar este concepto haya sufrido cambios importantes en estos años. Norberto Bobbio (2) expresa de forma adecuada un sentimiento social muy extendido cuando afirma que “quienes en tiempos habrían sido calificados de *ancianos venerables* pasaron a ser llamados sin grandes contemplaciones *esos vejstorios*”, unos viejos decrepitos de quienes no merece la pena ocuparse.

Lo primero que me viene a la cabeza siempre que escucho la palabra dignidad asociada a la persona mayor es el recuerdo de un artículo editorial publicado en los años setenta en la revista *New England Journal of Medicine* bajo la firma de quien era su director, el Prof. Franz Ingelfinger (3). Sus comentarios versaban sobre la “muerte digna”, un tema muy de actualidad por aquellos años. Señalaba Ingelfinger que, a la vista de las posibilidades tecnológicas que ofrecía la medicina parecía un sarcasmo asociar la palabra dignidad al proceso de morir. A su juicio, a lo más que podríamos aspirar era a no añadir indignidades en esas circunstancias. Salvando las distancias, creo que algo de eso cabe intuir cuando asociamos los términos dignidad y envejecimiento.

En la línea de Ingelfinger luchar por evitar las indignidades constituye otra forma de ver el tema. Supone tomar en consideración las dos caras de una misma situación. Por ello a efectos expositivos mis reflexiones van a ir en uno u otro sentido, asumiendo como hilo conductor el riesgo que representa poder ser víctima de indignidades. Me centraré en tres puntos: las pérdidas de nuestra reserva orgánica como factor de riesgo muy común dentro de este campo, la discriminación por edad como forma sutil y poco valorada de generar indignidad y la necesidad de asumir el mandato de Naciones Unidas (NU) en relación con un envejecimiento activo como actitud más positiva en el intento de mantener una vejez digna.

Antes de entrar en materia insistiré todavía en un punto de partida que no. Se trata de destacar y aceptar como no discutible el hecho de que los viejos constituimos hoy un problema social importante. No es un fenómeno nuevo, ya

que, más o menos atemperado, siempre ha sido así. Pero hoy somos muchos, más que en ninguna otra época, tanto en términos absolutos como relativos. Además, duramos una barbaridad como nunca antes se había pensado que pudiera ocurrir. Hemos aumentado nuestra esperanza de vida de tal manera que en estos inicios del siglo XXI la mayor parte de la población en los países desarrollados vamos a pasar entre un cuarto y un tercio de nuestra vida en calidad de jubilados, lo que traducido a efectos administrativos equivale a ser oficialmente viejos. Un reciente artículo de la revista *Lancet* (4) afirmaba que los nacidos en estos primeros años del siglo XXI en países desarrollados tienen grandes posibilidades de llegar a centenarios.

Constituimos lo que algún profesor de sociología (David Reher) ha calificado como “un maremoto” del que, además, la sociedad en su conjunto apenas si ha tomado conciencia. Un maremoto cuyas consecuencias alcanzan a todas las esferas de la vida. Comprometen a los sistemas sanitarios, a la economía, al mundo laboral, o a las formas de organización social y de convivencia, y lo hacen con unas repercusiones enormes que no escapan a ningún observador. Lo que parece menos comprensible es que este fenómeno que debiera ser un motivo de satisfacción individual y colectiva se traduzca para muchos en una especie de carga negativa y de invitación al pesimismo. Siguiendo con Bobbio, siempre dispuesto a asumir los aspectos más negros de la vejez, cabría considerar que los avances de la medicina a menudo “no tanto te hacen vivir cuanto te impiden morir”. En su caso esto se manifiesta a través de lo que él llama “una vejez melancólica, entendiendo la melancolía como la consciencia de lo no alcanzado y de lo que ya no es alcanzable”.

1. UN FACTOR DE RIESGO NO DISCUTIBLE: LAS PÉRDIDAS ASOCIADAS AL HECHO DE ENVEJECER

Una definición de envejecimiento bastante ajustada a la realidad científica es la que toma como base referencial las pérdidas en nuestros mecanismos de reserva y, ligado a ellas, el incremento progresivo de la vulnerabilidad y de la consiguiente claudicación ante cualquier tipo de agresión externa. Es cierto que nacemos con un margen de reserva enorme en todos nuestros órganos y sistemas. Son reservas funcionales que vamos perdiendo –o consumiendo- a lo largo de la vida. Pérdidas universales que desde el punto de vista orgánico afectan a todos y cada uno de nuestros aparatos. Al músculo, al hueso, a las articulaciones, a los sistemas cardiocirculatorio, digestivo, respiratorio, nervioso, endocrino, nefrourológico, inmunológico o sexual. A los sistemas de regulación de la homeostasis. A la piel, a la boca y a los órganos de los sentidos. Nada ni nadie escapa a ello, aunque la realidad nos muestra que la cadencia con la que estas pérdidas se van manifestando varía enormemente de unos individuos a otros. Más aún, que incluso existe también una gran variabilidad dentro de la propia persona,

dependiendo de factores que van desde la carga genética con la que hemos aterrizado en este mundo hasta el tipo de vida que lleva o ha llevado cada uno de nosotros.

Son pérdidas que nos convierten de manera progresiva en sujetos mucho más vulnerables. Facilitan la posibilidad de claudicar en forma de enfermedad o de limitación funcional. Empeoran los pronósticos y las posibilidades de superar con éxito las enfermedades agudas. Dan pie a un aumento en los procesos crónicos de los que surgen situaciones de dependencia. También a muertes prematuras ante provocaciones cada vez menos intensas. Unas pérdidas que no son sólo físicas. Tienen su correlato en la esfera psicológica y del comportamiento. Se traducen en un enlentecimiento generalizado físico, del pensamiento y del ánimo. Afectan a la esfera social, a nuestra situación en el entorno en el que nos movemos. Sin embargo, son pérdidas modulables por diferentes vías y que, especialmente en lo que respecta a estos últimos apartados, admiten numerosos factores correctores más o menos eficaces.

La pregunta clave en relación con el tema es si esta realidad que asocia pérdidas y envejecimiento puede resultar por sí misma lesiva para nuestra dignidad a ojos propios o ajenos. Si representa que nos convertimos en menos dignos ante los demás o ante nosotros mismos. La respuesta teórica y contundente es no. No tiene por qué ser así. La dignidad no es un valor intercambiable con la belleza, con una capacidad funcional óptima, con la salud o con cualquier otro parámetro positivo vinculado a la juventud. Podemos encontrar dignidad ante adversidades de cualquier naturaleza, incluidas las económicas o las situaciones de terminalidad. Por qué vamos a cuestionar su existencia en función de las pérdidas derivadas de haber alcanzado una edad a la que, por otra parte, todos aspiramos y que, en ningún caso, debe modificar los condicionantes más íntimos de la persona. Las posibles indignidades vendrían por otros caminos. Por vías, comportamientos y actitudes que no están marcadas por la edad y que pueden encontrarse en cualquier individuo, joven o no.

Sin embargo, según envejecemos es frecuente dejarse ir, renunciar a la exigencia de mantenerse digno en cualquier momento y circunstancia. Se trata de una tendencia social, vivida también en el mundo sanitario y que puede arrastrar al propio individuo. Una geriatra escocesa muy conocida afirma que la entrada en la categoría de paciente geriátrico viene dada por el “momento en el que el médico pierde interés por el estado de salud de su paciente”.

En el nacimiento de la especialidad de Geriátrica subyacen muchos de estos conceptos. Quienes concibieron, elaboraron y pusieron en práctica los principios básicos de la medicina geriátrica en el Reino Unido durante los años 40 y 50 del siglo pasado lo hicieron como una forma de rebelión contra el abandono y la

resignación. Intentaban afrontar los problemas de unos pacientes crónicos, “pluripatológicos” los llaman ahora, de los que nadie se ocupaba. Nació la geriatría para luchar contra el fatalismo y la resignación y concentrar esfuerzos en la recuperación funcional. Para encontrar y combatir situaciones clínicas, enfermedades y limitaciones, desconocidas previamente. Para integrar soluciones globales a los problemas médicos y sociales. También para prevenir en lo posible problemas médicos de alta incidencia y prevalencia. En suma para luchar por la dignidad de aquellos ancianos más desfavorecidos.

En último término, todos estos objetivos suponen un esfuerzo por combatir la indignidad social que representaba asumir como normal la existencia de una población mayor, cargada de patología crónica, marginada, desahuciada desde una perspectiva médica, abandonada por familia y sociedad en asilos y hospitales. Una población víctima de la “indignidad” social, no respetada, a la que se había privado de cualquier forma de autoestima, e individualmente resignada y condenada a su exclusión sanitaria y social. Esta actitud, presente ya en las raíces de la especialidad, se ha mantenido viva desde entonces en todos quienes la hemos cultivado.

2. LA DISCRIMINACIÓN POR EDAD COMO FORMA DE AGRESIÓN A LA DIGNIDAD DE LA PERSONA MAYOR

El eventual catálogo de indignidades potenciales con las que el conjunto de la sociedad castiga a la persona de edad avanzada es extraordinariamente amplio y tiene como elemento común la sorprendente evidencia de pasar inadvertido. Abarca desde la falta de respeto al principio bioético de autonomía en cualquiera de sus manifestaciones hasta el apartado de los malos tratos al mayor, bien lo sean en forma de agresión física directa, bien en su vertiente de comportamientos negligentes y de abusos psicológicos o económicos. Me centraré en el tema de la discriminación por edad, lo que la literatura inglesa conoce como “*ageism*” (Butler 1969), que podríamos traducir por *etaísmo* o *ageísmo*, otra forma de agresión a la dignidad del mayor, ignorada con frecuencia por ciudadanos y administraciones.

El *ageísmo*, la discriminación por edad, constituye una forma de agresión a la dignidad del colectivo de más edad. Una forma de agresión que tiene múltiples manifestaciones en el plano social, pero que también aparece en los ámbitos vinculados a la salud.

Con carácter general los ejemplos de discriminación social al anciano son múltiples. Enumeraré algunos. Se vulnera el principio de autonomía al decidir por el anciano tanto en el ámbito familiar como en otros. Se establecen limitaciones para la convivencia en el marco familiar y en el contexto social. Existen y no se toman en consideración barreras ciudadanas evitables en materias como iluminación, transportes,

arquitectura, regulación del tráfico, etc. Se legisla con frecuencia bordeando la frontera de algunos derechos; entre ellos los laborales, dentro de los cuales algunas formas de jubilación forzosa centradas en la edad podrían ser un buen prototipo. No se potencian estudios específicos. Se excluye o limita su participación en la política o en aspectos relativos a la gestión común de la vida pública. Se cortan o cuestionan los recursos sociales necesarios como pone en evidencia lo que está pasando con la Ley de Dependencia y con otras formas de limitación de derechos sociales. Se aplica un lenguaje sectario cargado de connotaciones negativas para denominar al colectivo. No hay más que analizar la utilización como insulto de las palabras viejo o anciano. Una gerontofobia social de la que dan testimonio abundante los medios de comunicación a la hora de tratar por la vía del ridículo o del chiste fácil numerosas imágenes del viejo.

En el plano sanitario la Ley General de Salud Pública (33/2011, 4 de octubre) sienta las bases para que la población española “alcance y mantenga el mayor nivel de salud posible a través de políticas, programas, servicios y actuaciones desarrolladas por los poderes públicos, empresas y organizaciones ciudadanas”. En ella se habla de prevención y de promover la salud de las personas en la esfera individual y colectiva. Quiero destacar que esta ley, como ocurre con la Ley General de Sanidad de 1986, pone énfasis en el derecho a la igualdad. El artículo 6 establece que “todas las personas tienen derecho a que las actuaciones de salud pública se realicen en condiciones de igualdad sin que pueda producirse discriminación por razón de nacimiento, origen racial o étnico, sexo, religión, convicción u opinión, edad, discapacidad, orientación o identidad sexual, enfermedad o cualquier otra condición o circunstancia personal o social”.

Sin embargo, las evidencias de discriminación son también abundantes en este campo e inundan las publicaciones científicas de las más variadas especialidades médicas. Como ejemplo basta repasar algunas áreas específicas como la cardiovascular o la oncológica. En ambas la evidencia demuestra que el grado de cumplimiento de protocolos y guías de actuación establecidos por las sociedades científicas correspondientes ante determinadas enfermedades o síndromes se cumplen en tanta menor medida cuanto mayor es la edad del colectivo analizado. Esto afecta a la profundidad de los estudios llevados a cabo en el anciano enfermo para sentar las bases del diagnóstico en toda su complejidad, pero afecta, sobre todo, a los protocolos terapéuticos, ante los cuales es muy frecuente aplicar una manga extraordinariamente ancha que permite, con el argumento de la edad, excluir de manera discrecional o en base a criterios no médicos opciones que no se hubieran ni siquiera discutido en los más jóvenes.

Situaciones de este tipo es posible encontrarlas igualmente en cualquier otra especialidad médica o quirúrgica que incluya pacientes de edad avanzada y son denunciadas periódicamente en las revistas más serias de la especialidad de turno. La cardiología o la oncología no pasan de ser meros ejemplos que he tenido la oportunidad de estudiar más directamente.

La discriminación sanitaria no se limita al cumplimiento negligente de unos protocolos diagnósticos o terapéuticos científicamente consensuados. Alcanza a otras muchas esferas, desde las limitaciones para acceder a las posibilidades que a día de hoy ofrece la alta tecnología, hasta la exclusión de pacientes mayores en los ensayos clínicos, pasando por la aplicación de políticas claramente discriminatorias en función de la edad por parte de las administraciones, que establecen topes arbitrarios a la hora de poder acceder a determinadas campañas de prevención o de revisiones del estado de salud. Cabría añadir aún la discriminación económica vinculada al mundo de la salud que representan decisiones como el copago farmacéutico o la imposición de trabas administrativas para acceder a algunos fármacos, productos o servicios sanitarios. La falta de interés de las autoridades académicas por la enseñanza de la gerontogeriatría o por potenciar recursos específicos para la población de más edad son otros ejemplos de lo mismo.

Discriminan las administraciones cuando utilizan la edad como criterio para determinadas campañas preventivas, por ejemplo para detección precoz de cáncer de mama, o al olvidarse de la persona mayor cuando se trata de establecer políticas sanitarias. No hace muchos años la Asociación Médica Británica se quejaba de que los ancianos fueran excluidos de las campañas antitabaco en aquel país.

Todas estas actitudes *ageístas* representan una agresión individual y colectiva contra la dignidad. En muchos casos atentan contra el derecho, pero, sobre todo lo hacen contra un principio básico en bioética, el principio de equidad. Van contra la tradición médica ejemplificada en el llamado juramento hipocrático. Con frecuencia atacan también a la evidencia científica al dar por supuestas contraindicaciones basadas en la edad que el tiempo se ocupa de desmentir. La práctica de lo que se conoce como angioplastia coronaria o de las diálisis crónicas son buenos ejemplos de procedimientos que entraron en medicina con el cartel de contraindicados en los mayores y sobre lo que hubo que dar marcha atrás muy poco tiempo después. Y, sobre todo, van también contra el propio sentido común. ¿Dónde deberíamos situar el punto de corte si tiramos de la edad como criterio para cualquier tipo de decisión?

Diré para cerrar este apartado que discriminamos, ofendemos y agredimos a la dignidad de la persona mayor cada vez que cualquiera de nosotros damos por buenas en el día a día frases tan habituales como las de: “bastante bien está Vd. para los años que tiene”, ó “a su edad que querrá”, o, peor aún, porque suele traducir ignorancia, cuando el profesional de la salud, ya sea médico, farmacéutico o enfermero, interpreta como “cosas de la edad” determinados problemas clínicos cuya causa desconoce, muchas veces incluso sin haberse tomado siquiera la molestia de indagar su origen.

3. EL LLAMADO ENVEJECIMIENTO ACTIVO COMO SISTEMA DE DEFENSA CONTRA LA INDIGNIDAD

Quizás una de las formas más adecuadas para hacer realidad de manera mantenida el concepto de dignidad aplicado al individuo de edad avanzada sea cumplir algunas de las recomendaciones con las que, periódicamente, los organismos internacionales y a su cabeza NU intentan incidir en el tema. Me voy a referir el lema del “envejecimiento activo” por considerar que constituye una clave paradigmática en este terreno. La II Asamblea Mundial del Envejecimiento (Madrid-2002) lo definía como “el proceso de optimización de las oportunidades de salud, participación y seguridad con el fin de mejorar la calidad de vida a medida que las personas envejecen”. Más adelante destacaba que había “llegado el momento de instaurar un nuevo paradigma que considere a las personas ancianas participantes activas de una sociedad que integre el envejecimiento y que las considere contribuyentes activos y beneficiarios del desarrollo”. Es decir, apelaba directamente a su dignidad por la vía de la participación social. Una década después NU insistía en el tema declarando oficialmente 2012 como el año del envejecimiento activo.

El objetivo obvio que se desprende de este lema estriba en que la persona que llega a una edad avanzada siga integrada y se mantenga viva y con responsabilidades dentro del engranaje social. Busca la dignificación de la persona mayor articulando su encaje en la sociedad, facilitando esa “sociedad para todas las edades” que ha sido otro de los lemas de NU. Hacerlo así supone un valor añadido en la medida en la que representa sumar al conjunto, con beneficios dobles. Para la sociedad -más personas arrimando el hombro- y para el individuo, que tendrá la oportunidad de mantener su contribución al bien común. Debemos ser conscientes de que la responsabilidad para llevar a buen puerto este objetivo corresponde a las dos partes, a la persona mayor a la que se pide actividad, y a quien no lo es pero puede, con su forma de actuar a través de las instituciones o con su comportamiento individual, facilitar –o dificultar- dicha actividad.

Con el “envejecimiento activo”, evidentemente, se buscan objetivos en salud, pero no sólo. También objetivos sociales de independencia, de movilidad en su sentido más amplio de la palabra, facilitar la posibilidad de desarrollar programas y trabajos que, remunerados o no, constituyan una continuidad con lo que ha sido la vida previa de cada uno y contribuyan al bien común. El individuo mayor debe proponérselo pero la sociedad en su conjunto, administraciones y personas más jóvenes, contribuir a hacer factible su realización. Una tarea que no siempre es fácil y que para poder culminar con éxito precisa superar diferentes escollos. En esta última parte de mi intervención voy a enumerar aquellos que considero más importantes. Algunas de las dificultades son intrínsecas, dependen del propio sujeto y de sus circunstancias personales, pero en muchos casos hay

que sumar a ellas las impuestas desde el exterior, obstáculos añadidos a la ya difícil tarea de no tirar la toalla. Me centraré en cinco puntos.

La primera dificultad viene de oficio. Como he señalado el envejecimiento se asocia con pérdidas orgánicas a todos los niveles y nos hace más vulnerables. La consecuencia es la acumulación de enfermedades agudas y, sobre todo, crónicas, las limitaciones funcionales que, en algunos casos, acaban llevándonos a situaciones de dependencia. Se consumen más fármacos, los controles sanitarios se hacen más frecuentes, crece la necesidad de contar con la figura del cuidador, etc. Son limitaciones intrínsecas, en parte inevitables, que pueden desmotivar e invitan poco a proseguir con una actividad mantenida. Primer obstáculo que hay que superar.

Otro capítulo, también centrado en la propia persona mayor, es el que tiene que ver con la necesidad de vencer muchas de las inercias que actúan en el sentido de dejarse ir una vez que la persona ha cumplido los principales preceptos de su rol en esta vida. Se manifiesta en frases o en sentimientos ligados al “ya he trabajado bastante”, “no tengo ánimos”, “es el turno de otros”, “que me dejen tranquilo”, “que me cuiden”, y expresiones similares. Puede ser una vía para el abandono y una puerta de entrada en “situaciones de indignidad”.

En el tercer apartado existen ya elementos externos. Tiene que ver con los problemas que surgen a la hora de asumir situaciones nuevas y está muy vinculado al salto cualitativo que representa la jubilación. Cambia la vida y hay que adaptarse a ello. Es habitual que coincidiendo con la edad jubilar tengan lugar modificaciones en el entorno inmediato, separación de los hijos, pérdidas familiares y de amigos, asunción del papel de abuelos, etc. Son retos muy serios, pero, para intentar envejecer de forma activa, resulta obligado buscar un nuevo papel social que permita superarlos, algo que afecta desde la ocupación del tiempo hasta la respuesta al ¿A qué me voy a dedicar ahora?

Por si fuera poco –cuarta dificultad- no es raro que se vuelva hostil buena parte del entorno más próximo, sobre todo aquel en el que se han vivido las fases inmediatas a la jubilación, en el marco de lo que ha sido la actividad laboral previa. Hay de todo. Las situaciones son muy plurales pero es mucho más frecuente de lo que cabría pensar que no se faciliten unas mínimas condiciones que permitan mantener cierta actividad en línea con lo que han sido las competencias del individuo durante toda su vida anterior. Más bien la experiencia demuestra que puede ocurrir lo contrario: puertas cerradas, malas caras, celos vinculados a frases como “lo que le cuesta a este dejar la silla”, zancadillas, empujones, etc. No es excepcional escuchar recomendaciones del tipo de “si quiere envejecer activamente que aprenda a jugar al golf o que cuide de los nietos”. Estamos ya

plenamente en el campo de los obstáculos extrínsecos, unas dificultades impuestas desde fuera y que se suman a todas las anteriores.

Pero todavía queda algo peor. El tan manido tema de la crisis ha facilitado la implantación de lo que puede calificarse como “castigo gubernamental”. Castigos añadidos, sobre todo de índole económica. En parte son comunes a los diseñados para otros grupos etarios, como ocurre con las pérdidas de poder adquisitivo, algo que, en el caso del anciano, ya se ha visto muy mermado previamente desde el momento en el que lo que era un sueldo se convierte en una pensión. También los impuestos municipales, autonómicos y estatales cada vez más altos. Otros castigos son específicos, copago farmacéutico, euro por receta, limitaciones crecientes en los recursos sociales o en la aplicación de la ley de dependencia, y lo que caiga. ¡Cállese y ayude en casa si sus hijos o sus nietos están en el paro! Las administraciones suelen hacer recaer las cargas máximas sobre los más débiles y el anciano está en ese grupo. Hacerlo así es más fácil. Genera menos contestación y menos problemas.

Bien, pues en ese contexto Naciones Unidas y a su rebufo todos quienes nos ocupamos de estas cuestiones, intentamos convencer a nuestros mayores para que mantengan su dignidad a través de envejecer activamente. En algunos casos, como en el de quien esto suscribe, predicando con el ejemplo, toda vez que, objetivamente, uno ya se siente inmerso con todas las consecuencias dentro de este colectivo.

4. A MODO DE COLOFÓN

Vemos que la dignidad del individuo se mantiene durante toda la vida. Ni las limitaciones que acompañan el proceso de envejecer, ni las diversas formas de agresión a que puede verse sometido el colectivo de más edad, constituyen argumentos suficientes para una pérdida de dignidad. La sociedad y los individuos deberemos asumir actitudes positivas y, en este contexto, lemas como el del envejecimiento activo, enunciados por organismos del prestigio de UN, representan una ayuda inestimable para mantener e incrementar ese elemento de excelencia que conocemos con el nombre de “dignidad” dentro del marco común. Terminaré de nuevo con Bobbio quien, en un homenaje expreso a la geriatría, habla de la nobleza de su fin “que no estriba sólo en aliviar los sufrimientos físicos, sino también ... en exhortar a quien está a punto de entrar en la última parte de su vida a no dejarse dominar por el temor, a veces obsesivo, de la decadencia, a sentirse un vencedor con respecto a los jóvenes muertos que son los vencidos y no él”.

*“A tu edad, si ves que se te escapa el autobús no corras.
Perderás el autobús y la dignidad” (María Salas)*

5. REFERENCIAS

- 1.-Valls R. La dignidad humana. En DMD Jornadas de derecho a morir dignamente. Ayuntamiento de Barcelona. Barcelona. 2000 pgs:89-104.
- 2.- Bobbio N. De Senectute. Ed Taurus. Madrid. 1997.
- 3.- Ingelfinger FJ. Empty slogan for the dying. N Engl J Med 1974; 291:845-46.
- 4.- Chistensen K, Doblhammer G, Vaupel JW. Aging population: the challenges ahead. Lancet 2009; 374:1196-1208.

INFORMACIÓN ACADÉMICA



Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia
e-mail: secretaria@ranf.com

Durante el segundo trimestre del año 2014, hemos realizado un total de diez sesiones científicas, de las cuales dos fueron dedicadas a Sesiones Necrológicas; dos mesas redondas y seis conferencias. También tuvo lugar en nuestra sede un Curso Avanzado sobre Obesidad y una serie de actos organizados en colaboración con diversas instituciones

SESIONES NECROLÓGICAS:

El pasado 8 de mayo, se celebró en nuestra Sede una Sesión Necrológica en memoria del Académico Numerario, en la Medalla 36, Excmo. Sr. D. Gaspar González González, en la que intervinieron los Excmos. Sres. Académicos de Número de la RANF, D. Albino García Sacristán, D. Bartolomé Ribas Ozonas y D. Bernabé Sanz Pérez que disertaron sobre tres diferentes facetas del Prof. González, como Profesor, como Académico y como Amigo, respectivamente.

“Gaspar González González: El Profesor”

El Dr. González se graduó en Veterinaria en la Escuela Superior de León en 1943, a la edad de 20 años. Revalidó sus estudios en la Escuela Superior de Madrid y posteriormente se doctoró en la Universidad Central -hoy Complutense-. Completó su formación en el CSIC, en el Instituto Social León XIII y con diversas estancias en el extranjero, tanto en Universidades como en centros de investigación agronómica. En la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, pasó por todas las categorías docentes. Fue Ayudante de clases prácticas, Profesor Adjunto por oposición, Encargado de Cátedra y en 1951 Catedrático numerario de Agricultura y Economía agraria, y Emérito desde su jubilación en 1987. En el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, fue, sucesivamente, Becario, Profesor Agregado, Director del Departamento de Producción Animal, Director Adjunto de Investigación y Director del Instituto de Alimentación y Producción animal. Así como también, Consejero de Número y Vocal del Consejo Ejecutivo, Vocal de la Junta de Gobierno y de la Comisión de Política Científica del Patronato Alonso de Herrera y de la Junta de Gobierno y Comisión Permanente de la División de Ciencias Matemáticas, Físicas y de la Naturaleza. Esta presencia, tanto en la Universidad como en CSIC, le permitió

generar a Don Gaspar, una intensa actividad investigadora con numerosas publicaciones de estudios experimentales, tanto en revistas extranjeras como nacionales, la intervención como ponente en 54 Congresos nacionales y 29 internacionales, la dirección de 34 tesis doctorales, así como la traducción de textos del inglés, como los de Stiles, Russell, Blaxter, Heady y Sppedingg o del italiano, como los libros de Tassinari y de Bonciarelli, todos ellos referentes a la agronomía y economía agraria. Además de esta fructífera actividad docente e investigadora el Profesor González realizó una intensa gestión académica. En la Facultad de Veterinaria fue Director de Departamento, Vicedecano, Decano y, finalmente, Vicerrector de la Universidad Complutense.

"Gaspar González González: El Académico"

La propuesta de Académico del Profesor Gaspar González fue cumplimentada y presentada por los Académicos Excmos. Sres. Ángel Vian Ortuño; Román de Vicente Jordana y Bernabé Sanz Pérez, con fecha del 14 de enero 1994 para cubrir la vacante del Excmo. Sr. Felipe Ángel Calvo y Calvo, cuyo fallecimiento tuvo lugar el 26 noviembre de 1992.

El Académico Ángel Vián Ortuño manifiesta en sus primeras palabras en la recepción de Gaspar como Académico: "Don Gaspar es un leonés recto, grande, talentado, amable y bien intencionado, con tanta curiosidad intelectual y, correlativamente, tanta vida interior que su atención salta a menudo de dentro a fuera de sí".

Fue elegido Académico el 17 de marzo de 1994 por la Junta General de la Corporación para ocupar la Medalla Nº 36 de Ciencias Afines; y tomó posesión en esta Real Academia el jueves 16 de marzo de 1995. Su discurso de ingreso tuvo por título: "Animales superiores y bienestar humano: ¿estamos legitimados para seguir usándolos?". Y al final de su discurso, Don Gaspar terminó con la frase: "He aquí, como colofón, la respuesta que me atrevo a aventurar: Sirvámonos de los animales, pero con la dignidad que confiere el habernos sido creados personas".

Nuestro homenajeado realizó sus actividades Académicas desde la fecha de ingreso, en la Sección 5ª: "Salud Pública, Alimentación y Medioambiente". Y el 21 de diciembre de 1996 la Junta de Gobierno acordó por unanimidad incluirle también en la Sección 2ª de esta Institución: "Biología, Biotecnología y Farmacogenómica". En representación de esta Sección 2ª, el 14 de octubre 2005 fue nombrado vocal de la "Comisión de Admisiones".

Algunas de sus frases y palabras nos permitían conocer más sobre sus ideas y su pensar, sabía que el fin de la economía, sobre el que le gustaba hablar, era precisamente estar al servicio de los demás, de los hombres, del país y de la humanidad. Y en consecuencia intervino en la Sesión científica del 18 de abril de 1995 con el título: "Algunas consideraciones ético-morales y técnico-económicas,

en torno a la interacción producción animal-medio ambiente". Sabía que la persona más rica no es la que más tiene, sino la que menos necesita.

El trabajo bien hecho de Don Gaspar, en seguir la buena dirección, en aunar fuerza y conocimientos, y en el saber hacer equipo, el 15 de octubre 2001 se le nombra coordinador del Foro sobre "La salud, prioridad en el Sexto Programa Comunitario del Medio Ambiente", que tendría lugar en Madrid, y en la sede de esta Real Academia, del 29 de octubre al 8 de noviembre de 2001. El tema de Don Gaspar tuvo por título: "Perspectivas de la demanda mundial de alimentos".

A Don Gaspar le importaba hablar de la vida, y de la humanidad, y decía que aquella pende y vivimos todos del campo; y es así que existimos por la agricultura. Y Don Gaspar nos decía en cierta ocasión, que la agricultura es la madre fecunda que proporciona todas las materias primeras que dan vida a los vivientes.

Seguimos enumerando el entusiasmo y cariño que mostró por esta Real Academia y sus compañeros Académicos, acudió a todas sus Sesiones científicas hasta que su actividad física se lo permitió y que mantuvo hasta su fallecimiento. Todos los Académicos le agradecemos que, nos deleitara con su amenidad, y nos brindara su respeto, amistad y cariño.

Se nos fue el querido y ejemplar Académico. Nos queda su trabajo y su recuerdo, que no es poco. Era un hombre completo un admirable castellano y ejemplar español. Esperaba mucho de España y él nos dio el ejemplo de darse a ella y de trabajar de forma altruista por nuestro país. Sigámoslo. Sus amigos intentamos seguir la pauta que siguió Gaspar, del trabajo bien hecho, y en equipo en bien de todos.

"Gaspar González González: El Amigo"

El Prof. Bernabé Sanz se refirió a su sentimiento de la amistad y a su cariñosa preocupación por sus compañeros, alumnos y colaboradores. Solo mostró unas pocas pinceladas del atractivo cuadro que constituyó su actividad vital.

Especial atención merecen sus relaciones con el profesor Albareda Herrera que fue primero su guía y mentor, después su compañero y consejero docente y siempre el amigo en quien confiar.

Otro miembro del círculo de amistades de Don José María Albareda, con quien Gaspar mantuvo gran amistad e intereses docentes fue el profesor don Lorenzo Vilas López. Ambos colaboraron en la creación de los Institutos Laborales de Enseñanza Media y participaron en el desarrollo curricular de los de modalidad agrícola y ganadera.

Conoció a don Gaspar en 1952 en Zaragoza. Le fue presentado por el Dr. Pascual López Lorenzo, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Veterinaria y compañero y amigo de Gaspar desde sus años de colegiales en el C. Mayor "César

Carlos" de Madrid. Entonces y siempre que nuestro académico venía por la Facultad de Zaragoza, no dejó de interesarse por el trabajo de quienes estábamos dando nuestros primeros pasos en la carrera docente. Para todos tenía siempre a punto unas palabras de ánimo y esperanza.

En junio de 1955 visitó el Instituto de Alimentación y Productividad Animal que dirigía Gaspar. Era una estación agroganadera experimental en miniatura, pero con un par de laboratorios bastante bien dotados para los años 50 del siglo pasado. Recuerda que 12 años después le decía, lleno de satisfacción y cariño refiriéndose a sus colaboradores, gracias a ellos, con esa estructura, mucha ilusión y no poco trabajo hemos conseguido que se nos conozca en el mundo científico europeo y norteamericano.

Cuando a primeros de diciembre de 1962 expuse mi primer ejercicio de las oposiciones a cátedra, vio entre el público asistente al profesor Gaspar González. Aguantó toda su exposición y esperó hasta que el tribunal hiciera públicas sus calificaciones. Siempre recordará esta prueba de amistad y apoyo moral.

Gaspar sabía callar y escuchar, dejaba que sus estudiantes y doctorandos expusieran sus propias ideas y al final las corregía o admitía. Lo hacía con sinceridad, en una mezcla delicada de prudencia y cortesía.

Otra buena cualidad de Gaspar era que no le importaba – y cree que hasta le gustaba – ceder protagonismo a sus colaboradores y doctorandos. En todo momento mantuvo una respetuosa amistad con quienes fueron sus maestros.

La obra de Gaspar continúa y continuará en su ausencia, gracias a la amistad y bien hacer que sembró en sus alumnos, diseminados por muchas cátedras universitarias, centros del CSIC, cuerpos especializados del Estado y de la UE, empresas agroganaderas, fábricas de pienso y por los cientos de alumnos que sabrán – decía – batirse a diario el cobre en ayuntamientos, granjas y pequeñas explotaciones ganaderas.

Persona profundamente religiosa y católico practicante, hoy reposa junto a los justos a la derecha del Padre. Descanse en paz!.

La Segunda Sesión Necrológica tuvo lugar el 11 de junio, en memoria del Excmo. Sr. D. Mariano Turiel de Castro, Académico Correspondiente de la RANF y Secretario de la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF. Dicho acto fue celebrado por la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Real Academia de Doctores de España, a la cual pertenecía como Académico de Número.

Abrió el acto el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF y actuaron como ponentes los Académicos de Número de la RANF y la RADE, Excmos. Sres. Dña. María Cascales Angosto, D. Julio Rodríguez Villanueva y Dña. Rosa Basante Pol. Cerró el Acto el Excmo. Sr. D. Jesús Álvarez-Fernández Represa,

Presidente de la RADE.

El Excmo. Sr. D. Mariano Turiel de Castro, nació en Vigo. Era doctor en Farmacia, periodista, Académico, profesor de la Universidad Complutense de Madrid y en los últimos años, presidente del Casino de Madrid, institución de la que fue su secretario durante más de doce años y presidente durante casi siete (fue elegido en el 2006 y reelegido en el 2010). Autor de varios ensayos y colaborador de programas de televisión como "La rebotica", tenía numerosos premios y distinciones.

MESAS REDONDAS

El 3 de abril tuvo lugar la Mesa Redonda organizada por la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales, en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF Sobre: "El Balneario Villa de Olmedo" (Valladolid). Contó con las ponencias de los Dres. Dña. Carmen de la Rosa Jorge, que habló sobre:

"Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario"; D. Miguel Ladero Alvarez, que realizó el estudio de

"El Entorno botánico del Balneario"; D. Juan Antonio López Lafuente, sobre

"Características generales de los suelos circundantes al Balneario"; y Dña. Josefina San Martín Bacaicoa, con su "Estudio de la acción terapéutica de las aguas del Balneario".

El 10 de abril la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la Mesa Redonda en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF sobre: "Situación actual de la Atención Farmacéutica Hospitalaria", coordinada por el Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez. Contó con las ponencias de las Dras. Dña. Amalia Torralba, Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Puerta de Hierro, que habló sobre "Conciliación del tratamiento terapéutico al ingreso y al alta hospitalaria"; Dña. Alicia Herrero, Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario La Paz, sobre "Programas para asegurar la atención Farmacéutica en pacientes hospitalizados" y Dña. Teresa Bermejo, Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Ramón y Cajal, sobre "Las nuevas tecnologías aplicadas al uso seguro de los medicamentos"

CONFERENCIAS, CELEBRADAS TODAS EN COLABORACIÓN CON AL FUNDACIÓN JOSÉ CASARES GIL DE AMIGOS DE LA RANF.

El 24 de abril tuvo lugar la conferencia "El Consejo Europeo de Investigación, cuatro mil ideas para mejorar el futuro de todos" a cargo del Dr. Pablo Amor, Director del European Research Council Executive Agency, quien fue presentado por el Presidente de la RANF, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban. En primer

lugar habló a modo de introducción la Dra. Cristina Gutierrez-Cortines, Eurodiputada y Catedrática de Historia del Arte que trató el tema "Una visión de la Investigación en Europa".

Ese mismo día también se celebró la conferencia impartida por nuestro Académico Extranjero, Prof. Christoph Friedrich, Professor for the History of Pharmacy, Direktor Institute für Geschichte der Pharmazie titulada: "Pharmacists in German Cultural History". Fue presentado por la Excma. Sra. Dña. M^a del Carmen Francés Causapé Académica de Número de la RANF.

El 22 de mayo tuvo lugar la conferencia titulada: "Competición Celular en el Embrión y el Mantenimiento de los Tejidos", en la que intervino el Dr. Miguel Torres, Director del Departamento de Desarrollo y Reparación Cardiovascular del CNIC. Fue presentado por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF.

La competición celular fue descubierta por los científicos españoles, Ginés Morata y Pedro Ripoll en 1975 en la mosca *Drosophila melanogaster*. Desde entonces el fenómeno sólo se había observado tras su inducción experimental. Nuestros estudios recientes describen por primera vez su función natural, y lo hace en mamíferos, indicando que se trata de un proceso natural y conservado a lo largo de la evolución.

En los primeros estadios del desarrollo embrionario de los mamíferos las células compiten intensamente por la supervivencia y, como resultado, las menos activas metabólicamente son eliminadas por sus hermanas. Las células vencedoras en este proceso son las que presentan mayores niveles de la proteína Myc, un controlador de la capacidad metabólica celular. El embrión temprano es un mosaico de células con niveles muy diferentes de Myc en el que las células con más Myc, más activas anabólicamente, eliminan a las de niveles más bajos. Sin embargo, es importante resaltar que las que mueren son células viables; su eliminación se produce únicamente porque el embrión cuenta con células más aptas capaces de reemplazarlas y por tanto se trata de un mecanismo de optimización, no de reparación.

Gracias a esta competición celular, el organismo en formación se optimiza durante el desarrollo, seleccionando las células con mayor capacidad anabólica y por tanto, previsiblemente, las más aptas para soportar las funciones vitales durante toda la vida del nuevo individuo. Este proceso se presume especialmente importante en organismos longevos, como los humanos, que deben mantener la funcionalidad de sus tejidos durante toda una larga vida. Cuando la competición celular se impide experimentalmente, las células con menor capacidad metabólica —que normalmente hubiesen sido eliminadas— pueden contribuir al nuevo

organismo que, predeciblemente, tendrá una menor aptitud que el organismo que se hubiera formado normalmente.

Recientemente hemos extendido estas observaciones a la fase de organogénesis y mantenimiento de los tejidos adultos. Las evidencias acumuladas indican que la competición celular es esencial en el mantenimiento de la homeostasis tisular, lo que abre las puertas a la investigación de su papel en procesos y enfermedades humanas en las que la homeostasis tisular es esencial, como la regeneración, la formación de tumores y las enfermedades degenerativas.

El 29 de mayo la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la Sesión en Honor al Dr. Michael G. Barbour con la conferencia impartida por el Académico de Número de la RANF, Excmo. Sr. D. Salvador Rivas Martínez quien abordó el "Avances sobre el estudio geobotánico del estado de California, EE. UU". El Dr. Rivas, leyó la laudatio en honor del Dr. Michael George Barbour y recibió en su nombre el Diploma como Académico Extranjero de la RANF.

El 5 de junio la Excmo. Sra. Dña. Ana M^a Pascual-Leone Pascual, Académica de Número de la RANF, pronunció su conferencia titulada: "El concepto Darwiniano de la Allostasis. Epigénesis".

El 12 de junio se celebró la conferencia titulada: "Prescripción de medicamentos fuera de la ficha técnica (off-label)", en la que intervino el Dr. D. José Ramón Luis-Yagüe, Director del Departamento de Relaciones con las CCAA de Farmaindustria, quien fue presentado por el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez, Académico de Número de la RANF.

CURSOS

La Real Academia Nacional de Farmacia celebró entre el 7 y el 10 de abril de 2014 el "I Curso Avanzado sobre Obesidad". Coordinado por los Dres. María Cascales Angosto, Bartolomé Ribas Ozonas y Francisco José Sánchez Muniz. Contó con las intervenciones de científicos y docentes del más alto nivel investigador.

El curso resultó un éxito abrumador debido a la gran cantidad de solicitudes de inscripción recibidas. Por tal motivo, una vez completo el cupo presencial con los alumnos matriculados, se amplió a la modalidad on line para profesionales.

OTROS ACTOS EN LA RANF

El 8 de abril los Laboratorios Merck realizaron en nuestra sede una Jornada de trabajo sobre Biosimilares, con los miembros de las Comisiones de Sanidad del Congreso y del Senado.

Asimismo han tenido lugar varios actos de COFARES dentro del ciclo sobre Patologías prevalentes tratando diversos temas como “Artrosis”, “Artritis-Gota” y “Osteoporosis”.

El 22 y 29 de abril tuvieron lugar dos reuniones de ASEDEF, con motivo de la publicación del Real Decreto de Precios recientemente publicado. Acudió el Director del Departamento de Precios del Ministerio de Sanidad.

El 23 de abril se realizó un Acto conjunto con PharmaMar sobre "Medicamentos con nuevos mecanismos de acción: innovación radical", con la bienvenida del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez y conferencia inaugural del Presidente Prof. Dr. José María Fernández-Sousa Faro. La jornada fue moderada por el Ilmo. Prof. Dr. Honorio Carlos Bando Casado, con las presentaciones del Ilmo. Prof. Dr. Alfonso Moreno González, Ilmo. Dr. D. Carlos Lens y la Ilma. Dra. Dña. Olga Delgado Sánchez.

Ese mismo día también tuvo lugar en la RANF un acto de Euractiv, que consistió en un Taller Mesa redonda sobre el problema del exceso de colesterol y sus implicaciones para la salud de los ciudadanos y del sistema sanitario español.

El 28 de abril hubo un Acto de la Fundación Ciencias de la Salud. “Las causas de la guerra de sucesión o el valor de una Historia Crítica”; organizada por el Académico Excmo. Sr. D. Javier Puerto Sarmiento.

El 22 de mayo de 2014 la Real Academia Nacional de Farmacia recibió a los Académicos Extranjeros Dres. Tadashi Goino y Rafael Melik-Ohanjanyan en el Solemne Acto de entrega de una nueva colección de grabados de arte Ukiyo-e. Se condecoró a ambos Académicos con la Medalla Carracido de plata de la RANF por la gran contribución realizada por y para la RANF.

El 26 de mayo tuvo lugar la Presentación del Libro: "Gestión Hospitalaria y acuerdos de riesgo compartido en España", organizada por la Universidad Internacional Menéndez Pelayo y UCB Pharma.

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos durante este último trimestre, hay que destacar que el pasado 19 de mayo de 2014 nuestra Académica de Número la Excmo. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, tomó posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña.

La Dra. Miras leyó su discurso de ingreso titulado: "Receptores de nucleótidos y su implicación en los mecanismos del dolor y la analgesia", y fue presentada a cargo del también Académico de Número de la RANF y RAFC el Excmo. Sr. D. Joan Guinovart Cirera.

El 12 de mayo se produjo la entrega de la Cruz de Honor de la Sanidad madrileña, en su categoría de oro otorgada por la Comunidad de Madrid a nuestra compañera Académica de Número la Excma. Sra. Dña. Rosa M. Basante Pol.



PUBLICACIONES ELECTRÓNICAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA