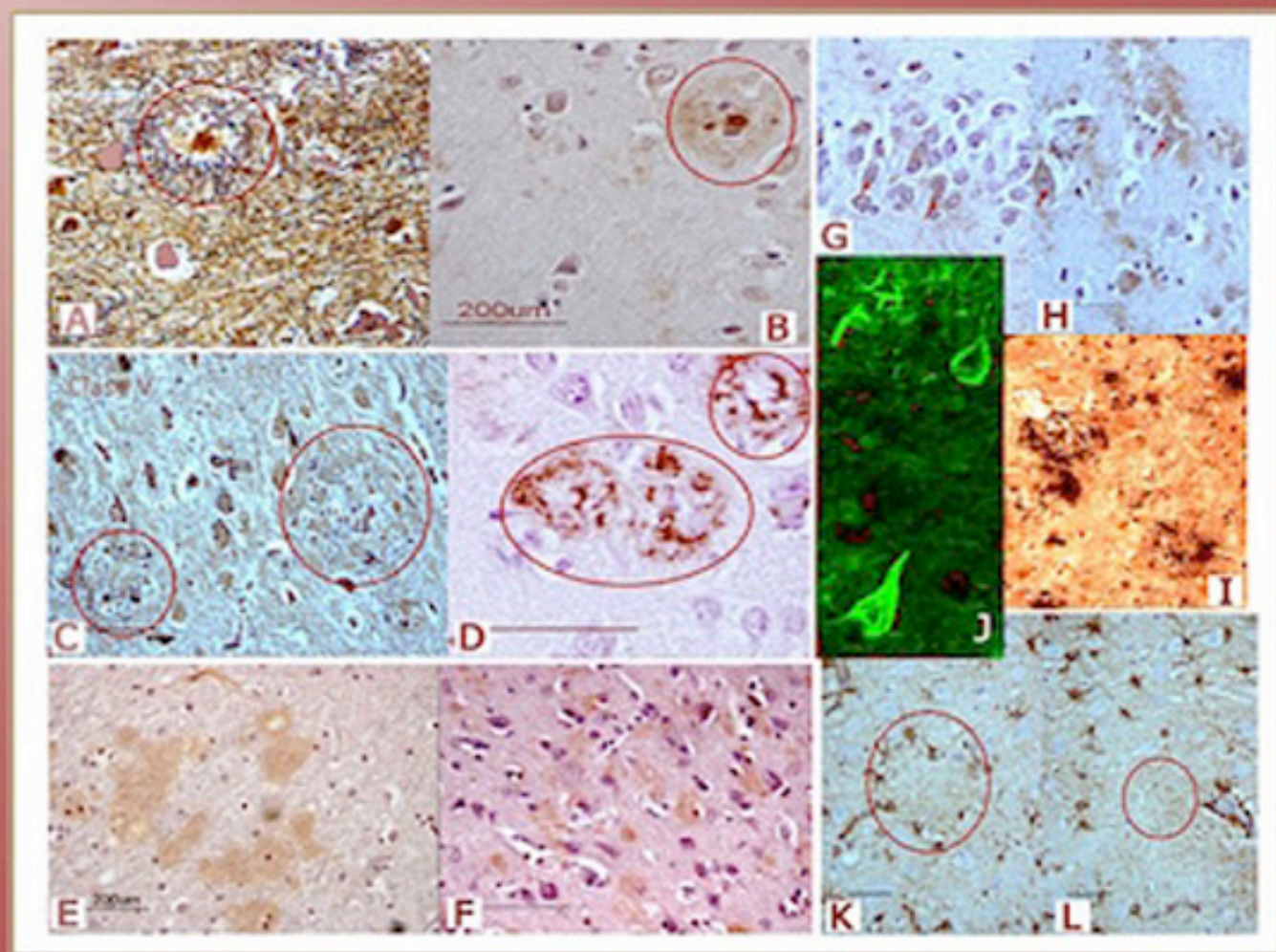


ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 80 | Número 3 | Julio-Septiembre 2014 | Páginas 453-640



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

“Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory”

Hait, N. C.; Wise, L. E.; Allegood, J. C.; O'Brien, M.; Avni, D.; Reeves, T. M.; Knapp, P. E.; Lu, J.; Luo, C.; Miles, M. F.; Milstien, S.; Lichtman, A. H.; Spiegel, S.; *Nat. Neurosci.* 2014, **17, 971-980**

FINGOLIMOD, ¿UN FÁRMACO PARA OLVIDAR?

Conforme aumenta el conocimiento de los procesos biológicos y se descubren nuevas dianas con posible interés terapéutico, se proponen aplicaciones para ciertos fármacos que son aparentemente dispares a aquellas para las que estaban previstos o eran utilizados. Uno de estos fármacos es fingolimod (FTY720, Gilenya®), utilizado desde 2010 para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM). Si culminan con éxito los estudios iniciales que se han publicado recientemente en la versión sobre neurociencia de la revista *Nature*, podría ser el primer fármaco utilizado para el tratamiento del trastorno por estrés postraumático (TEPT), uno de los trastornos de ansiedad. Las personas con este trastorno provocado por un accidente de tráfico, una agresión violenta, etc., podrían elegir “olvidar” y “extinguir el miedo” que provoca el recuerdo del trauma. Los experimentos realizados con fingolimod se han realizado en ratones a los que se administraban descargas eléctricas. Estos, aterrorizados, quedaban paralizados debido a la ansiedad, pero después de tomar fingolimod la ansiedad y el miedo se reducían.

Además del trastorno por estrés postraumático, la necesidad de olvidar experiencias negativas parece acompañar al hombre desde la antigüedad. Así lo expresaba Cicerón: *“Recuerdo lo que no quisiera recordar, y en cambio no puedo olvidar lo que quisiera dar al olvido...”*. El poeta inglés Alexander Pope (1688-1744), en su poema “Eloisa to Abelard” inspirado en la historia de Eloísa y su amor ilícito con el famoso profesor Pierre Abélard, expresa en el fragmento comprendido entre las líneas 207-2010 de este poema cómo, tras varios años de obligada separación, Eloísa manifiesta una angustia que sólo podría soportar con el

olvido absoluto de su amor por Abelardo:

“How happy is the blameless vestal's lot!

The world forgetting, by the world forgot.

Eternal sunshine of the spotless mind!

Each pray'r accepted, and each wish resign'd”

La importancia del olvido en las relaciones humanas es también protagonista de una película de ciencia ficción estrenada en 2004 que utilizó como titular la línea 209: *“Eternal sunshine of the spotless mind”* (“Olvídate de mí”).

BREVE HISTORIA DE FINGOLIMOD

Fingolimod (FTY720) recibió ese nombre por su semejanza estructural con la esfingosina (1), un metabolito de la esfingomielina que reduce la invasión del sistema nervioso central (SNC) por linfocitos T autorreactivos y, por tanto, el daño inflamatorio. Desarrollado por Novartis y comercializado como Gilenya®, fue el primer fármaco oral aprobado por la FDA en 2010 para el tratamiento de las formas recurrentes de esclerosis múltiple (EM). La agencia europea (EMA) fue más cautelosa, aprobándolo como fármaco de segunda elección para aquellos pacientes sin respuesta a los tratamientos estándar y para los que presentan una EM agresiva desde su inicio.

Fingolimod se obtuvo por manipulación química del metabolito fúngico myriocina (ISP-1), aislado en 1992 de cultivos del ascomiceto *Isaria sinclairii*, un hongo conocido en la medicina tradicional china como “hongo de la eterna juventud” (2). Este descubrimiento formó parte de un programa de búsqueda de compuestos con actividad inmunosupresora, potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en el trasplante de órganos, a partir de productos naturales aislados de distintos hongos. Myriocina inhibe la enzima serinapalmitoil transferasa, que cataliza la síntesis de 3-ceto-esfinganina a partir de palmitoil-CoA y serina y, en consecuencia, la proliferación de las células T. Myriocina es de 10 a 100 veces más potente que la ciclosporina, pero es tóxica y muy poco soluble, por lo que su estructura se manipuló para optimizar sus propiedades farmacológicas. Uno de los compuestos sintetizados, el 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]-1,3-propanodiol, denominado en principio FTY720 y después fingolimod, tenía un comportamiento distinto al de otros inmunosupresores clásicos como metotrexato y mitoxantrona, carecía de los efectos tóxicos de la myriocina, no inhibía la proliferación y activación de los linfocitos T y B ni la producción de citocinas o anticuerpos, y tampoco modificaba la actividad de la serinapalmitoil transferasa, pero sí inhibía el tráfico entre los órganos linfoides y la sangre (3). Los estudios para determinar su mecanismo de acción demostraron

que la forma biológicamente activa de fingolimod es el metabolito fosforilado (*S*) FTY720-P, el cual se une especialmente a los receptores de esfingosina-1-fosfato tipo 1 (S1P1)¹ en los timocitos y linfocitos, produciendo la internalización aberrante de dichos receptores y dejando a la célula sin receptores disponibles para la acción del ligando endógeno esfingosina fosfato (4). Esto impide la migración de los leucocitos a los tejidos inflamatorios periféricos (5).

La fosforilación de fingolimod y de esfingosina está catalizada por la enzima esfingosina cinasa 2 (SphK2) (6), que da lugar a los metabolitos activos (*S*) fingolimod fosfato y esfingosina-1-fosfato (S1P), respectivamente (Figura 2). Ambos compuestos compiten como sustratos por esta enzima y, a su vez, sus metabolitos fosforilados compiten por los receptores S1P. Fingolimod fosfato es agonista de los 5 subtipos de receptores que se conocen (S1P1–S1P5), siendo la interacción con el receptor S1P1 particularmente importante.

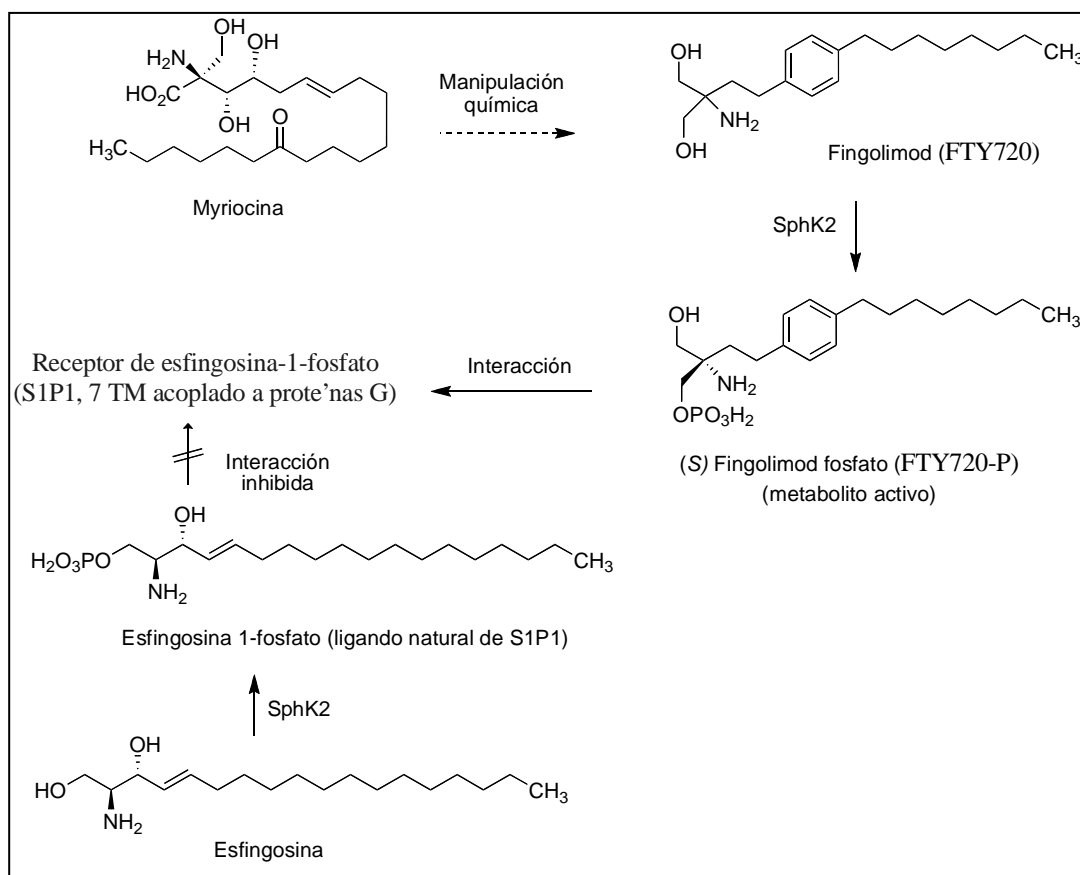


Figura 2.- Descubrimiento y mecanismo de acción de fingolimod.

El paso de los linfocitos T vírgenes (T_n, del inglés *naive*) y de los linfocitos T centrales de memoria (TCM) (7) a la linfa desde los ganglios linfáticos es un proceso dependiente de los receptores S1P1 y, cuando estos receptores se destruyen por la acción del fingolimod, los linfocitos quedan retenidos de forma reversible dentro de los ganglios. La estimulación de los receptores S1P1

¹ Los receptores S1P son proteínas con 7 dominios de transmembrana acoplados a proteínas G.

contrarresta en los linfocitos las señales de retención de leucocitos mediadas por el receptor CCR7 y otros receptores acoplados a G α i (8). Por tanto, si estos receptores se inhiben, hay menos linfocitos autorreactivos circulantes que puedan generar un daño inflamatorio. Si se suspende el tratamiento con fingolimod, ambos tipos de linfocitos vuelven a la circulación general en un lapso promedio de 1 a 2 meses, siendo totalmente funcionales. Por el contrario, los linfocitos T efectores de memoria (TEM), que realizan funciones de inmunovigilancia y se alojan en tejidos, preservan su función inmune no son afectados por fingolimod porque no recirculan entre la sangre y los ganglios linfáticos (9).

La posible aplicación de fingolimod para prevenir el rechazo en los trasplantes de órganos se abandonó pronto, ya que los primeros estudios reflejaron su baja potencia (10). Entonces se centraron los estudios en varios modelos de enfermedades autoinmunes, como artritis, dermatitis, miocarditis, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, y encefalomiелitis experimental autoinmune (11). Teniendo en cuenta que fingolimod es una molécula lipófila y que las neuronas y células gliales expresan receptores S1P, no es de extrañar que se estudiara también su papel como neuroprotector de la remielinización o reparación neuronal (12).

Dentro de esta línea de trabajo, se iniciaron en 2002 los estudios clínicos de fase II en pacientes con esclerosis múltiple (EM), y entre 2006 y 2009 se desarrollaron dos estudios clínicos de fase III. Los correspondientes resultados fueron la base para su presentación en distintas agencias sanitarias como fármaco de elección en el tratamiento de dicha enfermedad (13).

BREVE COMENTARIO SOBRE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Esta enfermedad, de probable etiología autoinmune, es la principal causa de discapacidad neurológica no traumática en adultos jóvenes, y se caracteriza por la aparición de lesiones desmielinizantes, neurodegenerativas y crónicas en el SNC, con pérdida de oligodendrocitos y neuronas (14). Aunque ha aumentado el conocimiento sobre ella y se han desarrollado diversos fármacos, todavía se desconoce su causa y no existe un tratamiento curativo. De entre las varias formas clínicas que presenta la EM, en el momento del diagnóstico la mayoría de los pacientes se encuentran en un proceso remitente-recidivante (EMRR), caracterizado por recaídas seguidas de recuperación. Buena parte de estos pacientes progresa con el tiempo a la forma secundaria progresiva (EMSP), con un aumento constante de la discapacidad. Según la Sociedad Española de Neurología (SEN), en España padecen esta enfermedad unas 47.000 personas y cada año se diagnostican unos 1.800 casos nuevos.

Además de fingolimod, que como ya se ha mencionado fue el primer fármaco oral aprobado para su tratamiento, existen otros fármacos que tratan de reducir la frecuencia de recaídas y de posponer la progresión de la discapacidad. Algunos tratamientos utilizan interferón- β (IFN- β)1a administrado por vía intramuscular (Avonex[®]) o subcutánea (Rebif[®], Betaferon[®]). También se usa glatirámico acetato (Copaxone[®]) administrado por vía subcutánea, un péptido sintético originado por polimerización de L-alanina, L-glutámico, L-lisina y L-tirosina, con una estructura parecida a la de la proteína básica de la mielina. Natalizumab (Tysabri[®]), un anticuerpo monoclonal humanizado específico de la subunidad $\alpha 4$ de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (también conocida como VLA-4),² se administra mensualmente por infusión intravenosa (15). También se utilizan o están en estudio otros anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes antígenos, como rituximab (Mabthera[®]), alemtuzumab (Lemtrada[®]), ocrelizumab y ofatumumab (Arzerra[®]). Además de fingolimod, se estudian otros fármacos que pueden administrarse oralmente, como laquinimod (que inhibe citocinas proinflamatorias y activa citocinas antiinflamatorias) (16) o teriflunamida (Tecfidera[®]), que es el metabolito activo del fármaco leflunomida (Arava[®]) utilizado en el tratamiento de la artritis reumatoide (Figura 3). Teriflunamida, aprobada por la FDA en 2012 y por la EMA en 2013, es un inmunomodulador que bloquea la enzima mitocondrial dihidroorotato deshidrogenasa y en consecuencia la síntesis de pirimidina, inhibiendo la proliferación de linfocitos T y B.

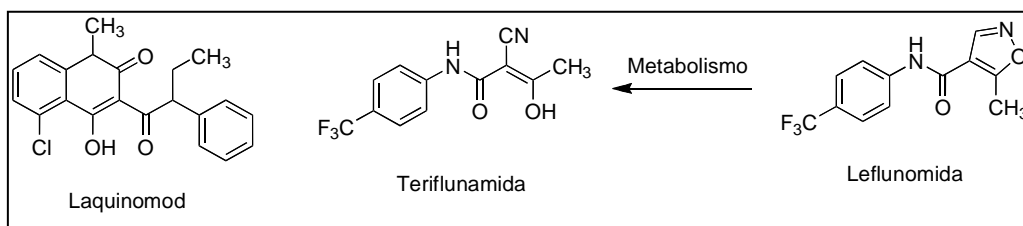


Figura 3.- Algunos fármacos orales con posible utilidad en el tratamiento de la EM.

¿CÓMO AYUDA FINGOLIMOD A SUPRIMIR LA SENSACIÓN DE MIEDO?

S1P posee actividades intracelulares importantes y está presente en el núcleo de muchas células. Allí, S1P se enlaza a histona desacetilasas 1 y 2 (HDAC1 y HDAC2), enzimas que catalizan la hidrólisis de los residuos *N*-acetilados de las histonas que rodean al ADN en los nucleosomas (Figura 4) y, por ello, su inhibición aumenta el nivel de histonas acetiladas.

² Esta integrina es un receptor celular expresado en la mayoría de los leucocitos que juega un papel importante en los procesos de adhesión, migración, y activación de los mismos. Los anticuerpos anti-VLA-4 o los antagonistas de estos receptores evitan el daño tisular en enfermedades inflamatorias al inhibir la infiltración de los leucocitos al tejido extravascular (el SNC en la EM).

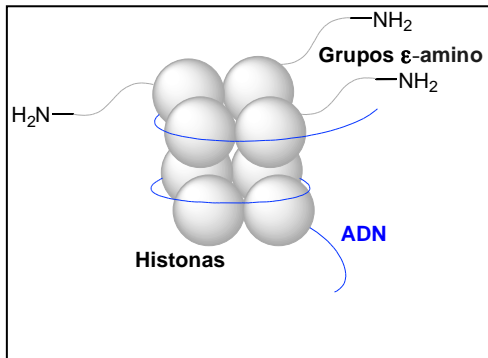


Figura 4.- Estructura esquemática de un nucleosoma

La regulación la expresión genética implica, entre otros factores, modificaciones en la cromatina producidas por mecanismos epigenéticos entre los que se encuentra la acetilación o desacetilación de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de las histonas que rodean al ADN en los nucleosomas. Aunque las histonas no interactúan directamente con las polimerasas en la transcripción genética su modificación puede afectar al modo en que se enrolla el ADN. Los grupos ϵ -amino básicos de los residuos de lisina de las histonas que rodean al ADN en los nucleosomas están protonados en condiciones fisiológicas e interactúan electrostáticamente con los grupos fosfato del ADN. En consecuencia, el acceso de polimerasas y factores de transcripción necesarios para la transcripción está impedido por lo que esta disminuye, lo que significa una señal de “apagado” (Figura 5). La acetilación de estos grupos elimina dicha carga positiva y debilita las interacciones histona-ADN, lo que supone la activación de la transcripción y una señal de “encendido”. Los inhibidores de HDACs, al impedir la desacetilación y aumentar el nivel de histonas acetiladas producen también una señal de “encendido”.

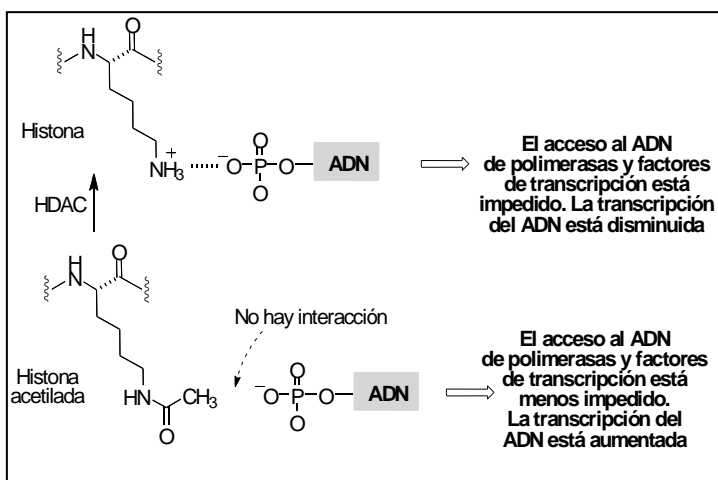


Figura 5.- Cómo afecta la acetilación de histonas a la transcripción del ADN.

Independientemente de sus efectos sobre el tráfico de las células del sistema inmune, fingolimod también tiene efectos beneficiosos sobre el CNS, aunque todavía no se conocen bien. En la reciente publicación de *Nature Neuroscience* que da título a este artículo, se ha demostrado que se acumula en el hipocampo de los ratones y que, tras penetrar en el núcleo celular, análogamente a lo que ocurre con el ligando natural S1P, su metabolito fosforilado (FTY720-P) actúa de forma análoga a S1P (17), inhibiendo la histona desacetilasa 1 (HDAC1), es decir, actúa por un mecanismo epigenético. Los grupos amino e hidroxilo de FTY720-P y S1P podrían actuar aquí formando un quelato con el Zn^{2+} , necesario para la catálisis, de forma análoga a otros inhibidores HDAC que poseen un ácido hidroxámico, por ejemplo SAHA.

Casi todos los inhibidores de HDACs inducen la expresión del gen *p21WAF1/CIP1*, que origina la inhibición de la formación del complejo ciclina D-CDK4 y, en consecuencia, la parada del ciclo y la diferenciación celular. Por esta razón tienen interés en el desarrollo de fármacos anticáncer (18), aunque los cambios epigenéticos en un gen varían según sea el tipo de célula, el estado de desarrollo y la edad del paciente.

Para investigar si FTY720-P puede afectar al aprendizaje y a la memoria como otros inhibidores HDAC (19), se utilizaron ratones inmuno-deficientes, ya que el sistema inmune tiene efectos complejos en el aprendizaje y la memoria (20). De hecho se ha comprobado que, tras la extinción de la inmunidad adaptable en ratones adultos, existe una relación entre la ausencia de linfocitos T y la pérdida de la función cognoscitiva. La transferencia de células T contra autoantígenos del SNC reduce la pérdida de neuronas y los defectos funcionales post-traumáticos, y el desarrollo de vacunas mediadas por células T podría ser prometedor para el tratamiento de las demencias asociadas a la edad y de otras disfunciones cognitivas asociadas al declive de la función inmune (21). Los autores de la noticia que nos ocupa comprobaron que los ratones *Sphk2^{-/-}* (*SphK2* “knockout”), carentes de la enzima que fosforila a esfingosina y a fingolimod, mostraban una disminución en la extinción del miedo. La fosforilación nuclear de FTY720 por *SphK2* permite su enlace al dominio catalítico de las HDAC1, y su consiguiente inhibición. Esto produce un aumento en la acetilación de ciertas histonas que puede inducir un aumento en la transcripción requerida para los procesos de la memoria a largo plazo, incluyendo su extinción (Figura 6) (22).

Por lo tanto, fingolimod fosforilado, al inhibir HDACs en el hipocampo, es el responsable de la extinción del miedo observada en ratones, y podría ser útil para facilitar la supresión de memorias asociadas a acontecimientos adversos. Todavía no se sabe si tendrá el mismo efecto en humanos y si será útil en el tratamiento del TEPT. Recientemente, un equipo de la Universidad Pompeu Fabra ha demostrado

también en ratones, que el sistema hipocretina/orexina-1³ influye en el mecanismo de la memoria para guardar más o menos cantidad de recuerdos adversos o malas experiencias vitales y hacerlo con mayor o menor profundidad, con lo que se abre la posibilidad de elaborar tratamientos para fobias, miedos o estrés postraumático. Tras la adquisición de este tipo de estrés, el bloqueo del receptor-1 de hipocretina producido por el antagonista no peptídico SB-334867 facilitó su extinción. Este efecto estaba asociado a un aumento en la expresión de cFos en la amígdala basolateral y en el cortex infralímbico (23).

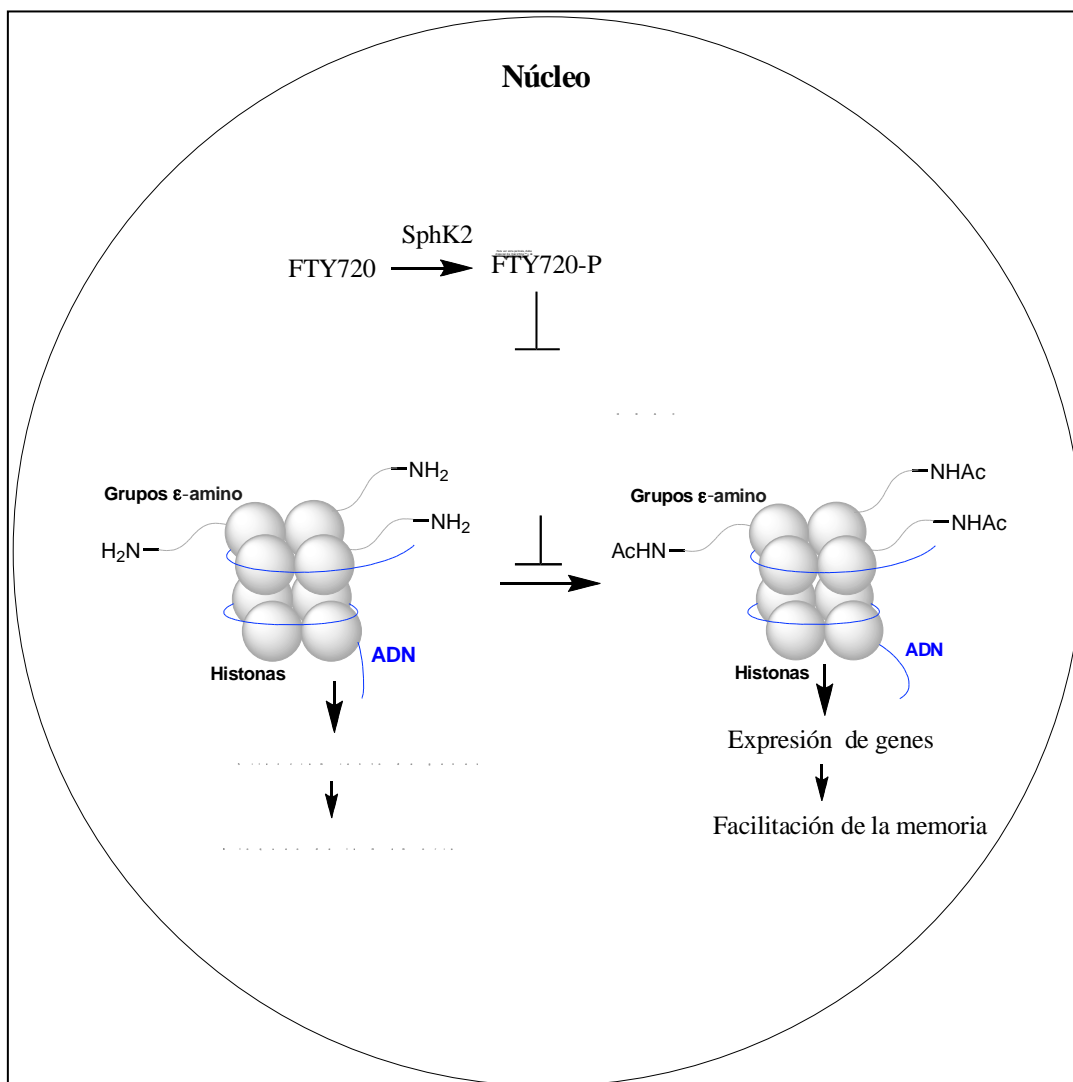
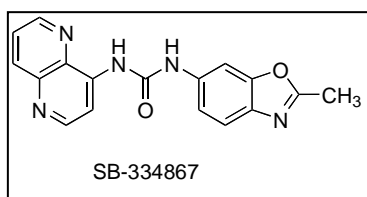


Figura 6.- Funciones de FTY720-P en el núcleo celular.



³ Las hipocretinas (orexinas) son neuropéptidos que juegan un papel importante en la regulación del apetito, el sueño y la excitación.

REFERENCIAS

1. Suzuki, S.; Li, X. K.; Enosawa, S.; Shinomiya, T. "A new immunosuppressant: FTY720, induces bcl-2-associated apoptotic cell death in human lymphocytes" *Immunology* **1996**, *89*, 518-523.
2. a) Adachi, K.; Kohara, T.; Nakao, N.; Arita, M.; Chiba, K.; Mishina, T.; Sasaki, S.; Fujita, T. "Design, synthesis and structure-activity relationships of 2-substituted 2-amino-1,3-propanediols: Discovery of a novel immunosuppressant, FTY720" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 853-856. b) Fujita, T.; Hirose, R.; Yoneta, M.; Sasaki, S.; Inoue, K.; Kiuchi, M.; Hirase, S.; Chiba, K.; Sakamoto, H.; Arita, M. "Potent immunosuppressants, 2-alkyl-2-aminopropane-1,3-diols" *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4451-4459.
4. Brinkmann, V. "Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology" *Pharmacol. Ther.* **2007**, *115*, 84-105.
5. Matloubian, M.; Lo, C. G.; Cinamon, G.; Lesneski, M. J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M. L.; Proia, R. L.; Cyster, J. G. "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1" *Nature* **2004**, *427*, 355-360.
6. a) Albert, R.; Hinterding, K.; Brinkmann, V.; Guerini, D.; Müller-Hartweg, C.; Knecht, H.; Simeon, C.; Streiff, M.; Wagner, T.; Welzenbach, K.; Zecri, F.; Zollinger, M.; Cooke, N.; Francotte, E. "Novel immunomodulator FTY720 is phosphorylated in rats and humans to form a single stereoisomer. Identification: chemical proof, and biological characterization of the biologically active species and its enantiomer" *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5373-5377. b) Bandhuvula, P.; Tam, Y. Y.; Oskouian, B.; Saba, J. D. "The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity" *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 33697-33700.
7. Seder, R. A.; Darrah, P. A.; Roederer, M. "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design" *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 247-259.
8. Pham, T. H.; Okada, T.; Matloubian, M.; Lo, C. G.; Cyster, J. G. "S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by Gai-coupled receptors to promote T cell egress" *Immunity* **2008**, *28*, 122-133.
9. a) Metzler, B.; Gfeller, P.; Wiczorek, G.; Li, J.; Nuesslein-Hildesheim, B.; Katopodis, A.; Mueller, M.; Brinkmann, V. "Modulation of T cell homeostasis and alloreactivity under continuous FTY720 exposure" *Int. Immunol.* **2008**, *20*, 633-644. b) Pham, T. H.; Baluk, P.; Xu, Y.; Grigorova, I.; Bankovich, A. J.; Pappu, R.; Coughlin, S. R.; McDonald, D. M.; Schewab, S. R.; Cyster, J. C. "Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning" *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 17-27.
10. Kunzendorf, U.; Ziegler, E.; Kabelitz, D. "FTY720-the first compound of a new promising class of immunosuppressive drugs" *Nephrol. Dial. Transplant* **2004**, *19*, 1677-1681.
11. a) Matsuura, M.; Imayoshi, T.; Chiba, K.; Okumoto, T. "Effect of FTY720, a novel immunosuppressant, on adjuvant-induced arthritis in rats" *Inflamm. Res.* **2000**, *49*, 404-410. b) Kitabayashi, H.; Isobe, M.; Watanabe, N.; Suzuki, J.; Yazaki, Y.; Sekiguchi, M. "FTY720 prevents development of experimental autoimmune myocarditis through reduction of circulating lymphocytes" *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2000**, *35*, 410-416. c) Kohno, T.; Tsuji, T.; Hirayama, K.; Watanabe, K.; Matsumoto, A.; Kohno, T.; Fujita, T. "A novel immunomodulator, FTY720, prevents spontaneous dermatitis in NC/Nga mice" *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1392-1396. d) Mansoor, M.; Meléndez, A. J. "Recent trials for FTY720 (fingolimod): a new generation of immunomodulators structurally similar to sphingosine" *Rev. Recent Clin. Trials* **2008**, *3*, 62-69.
12. a) Balatoni, B.; Storch, M. K.; Swoboda, E. M.; Schönborn, V.; Koziel, A.; Lambrou, Balatoni, B.; Storch, M.K.; Swoboda, E.M.; Schonborn, V.; Koziel, A.; Lambrou, G.N.; Hiestand, P.C.; Weissert, R.; Foster, C.A. "FTY720 sustains and restores neuronal function in the DA rat model of MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis" *Brain Res. Bull.* **2007**, *74*, 307-316. b) Webb, M.; Tham, C. S.; Lin, F. F.; Lariosa-Willingham, K.Yu, N.; Hale, J.; Mandala, S.; Chun, J.; Rao, T. S. "Sphingosine 1-phosphate receptor agonists attenuate relapsing-remitting experimental autoimmune encephalitis in SJL mice" *J. Neuroimmunol.* **2004**, *153*, 108-121. c) Kataoka, H.; Sugahara, K.; Shimano, K.; Teshima, K.; Koyama, M.; Fukunari, A.; Chiba, K. "FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration" *Cell Mol. Immunol.* **2005**, *2*, 439-448.
13. a) Brinkmann, V.; Billich, A.; Baumruker, T.; Heining, P.; Schmouder, R.; Francis, G.;

- Aradhye, S.; Burtin, P. "Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis" *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 883-897. b) Vasiliou, S. "Oral Fingolimod for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis" *Drugs Today* **2010**, *46*, 315-325.
14. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* **2002**, *359*,1221-1231.
15. a) Putzki, N.; Baranwal, M. K.; Tettenborn, B.; Limmroth, V.; Kreuzfelder, E. "Effects of natalizumab on circulating B cells: T regulatory cells and natural killer cells", *Eur. Neurol.* **2010**; *63*, 311-317. b) Buttmann, M. "Treating multiple sclerosis with monoclonal antibodies: a 2010 update" *Expert Rev. Neurother.* **2010**, *10*, 791-809. c) Niino, M.; Sasaki, H. "Update on the treatment options for multiple sclerosis" *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2010**, *6*, 77-88.
16. Comi, G.; Jeffery, D.; Kappos, L.; Montalban, X.; Boyko, A.; Rocca, M. A.; Filippi, M.; Allegro Study, G. "Placebo-Controlled Trial of Oral Laquinimod for Multiple Sclerosis" *New Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 1000-1009.
17. a) Igarashi, N. et al. Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46832-46839. b) Hait, N.C. et al. "Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine- 1-phosphate" *Science* **2009**, *325*, 1254-1257.
18. Carey, N.; La Thangue, N. B. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 369.
19. Fischer, A.; Sananbenesi, F.; Mungenast, A.; Tsai, L. H. "Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders" *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 605-617.
20. Brynskikh, A.; Warren, T.; Zhu, J.; Kipnis, J. "Adaptive immunity affects learning behavior in mice" *Brain Behav. Immun.* **2008**, *22*, 861-869.
21. Brynskikh, A., Warren, T., Zhu, J., Kipnis, J. "Adaptive immunity affects learning behavior in mice" *Brain Behav. Immun.* **2008**, *22*, 861-869.
22. Matheos, D. P.; Word, M. A. "Unlocking the constraints on memory formation", *Nature Neurosc.* **2014**, *17*, 895-896.
23. Flores, A.; Valls-Comamala, V.; Costa, G.; Saravia, R.; Maldonado, R.; Berrendero, F. "The Hypocretin/Orexin System Mediates the Extinction of Fear Memories" *Neuropsychopharmacology* **2014** doi: 10.1038/npp.2014.146.

El concepto darwiniano de la allostasis. Epigénesis

Ana M^a Pascual-Leone Pascual

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia
e-mail: anamariapascualleone@gmail.com

Recibido el jueves 5 de octubre de 2014

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, N^o 3 (2014), pag. 466-499.

RESUMEN

El concepto de allostasis fué establecido a finales del siglo pasado como el conjunto de respuestas de los organismos vivos, regidas por el cerebro, para conservar su equilibrio interno y, por tanto, su supervivencia. Pero todo ello tiene resonancias Darwinianas .

Cuestiones establecidas en el siglo XX. El axis HPA – hipotálamo –pituitaria-adrenal- es el más importante entre todos los sistemas movilizados por la allostasis. Y este axis se programa en periodo gestacional en los mamíferos. Cuando circunstancias de estrés maternal activan su axis HPA, grandes cantidades de glucocorticoides (GC) pasan al feto, y su axis HPA se programa de forma anómala, e irreversible en periodo adulto, además, se reduce el peso al nacimiento. Y todo ello es factor de riesgo de posibles patologías adultas (diabetes 2, cardiovasculares o hipertensión crónica). La causa es la reducción de receptores de glucocorticoides (GR) en el hipocampo, ya que ellos ejercen una acción tónica en la retroalimentación negativa del axis HPA. Sin embargo, se desconocía, en el siglo XX, por qué mecanismo los GC reducen la expresión de GR en hipocampo.

Cuestiones establecidas en siglo XXI. Se eligen y exponen una serie de trabajos publicados en el siglo XXI sobre esta vertiente que nos han llevado al conocimiento de que la reducción en hipocampo de los GR se produce por un mecanismo epigenético. Sucintamente, se enumeran los principales mecanismos epigenéticos conocidos. Finalmente, se enuncian las grandes posibilidades terapéuticas que abren estos mecanismos epigenéticos para el futuro y para la posible explicación de procesos evolutivos

Palabras clave: Allostasis; periodo gestacional; axis HPA; epigénesis; Darwin.

ABSTRACT

The Darwinian concept of allostasis. Epigenetic programming

At the end of last Century the concept of allostasis was proposed as the group of responses from live beings, regulated by the brain, leading to maintain the organism balance and, therefore, to survival. But this concept has clear Darwinian significance.

Questions established in the XX Century. The HPA (hypothalamus-pituitary-adrenal gland) axis is the most important among all regulatory systems triggered by allostasis, and it is programmed during the gestational period in mammals. Under a stressful situation the mother HPA axis operates secreting high amounts of glucocorticoids (GC) that get into the foetus affecting to the normal HPA programming; this abnormal development is irreversible in adulthood and will also reduce birth weight. Besides, it is a risk factor for possible adult pathologies such as diabetes mellitus type 2, cardiovascular disease or chronic hypertension. The reason is the decrease of glucocorticoid receptors (GR) in hippocampus, since they are crucial for the negative feedback of HPA axis. However, the mechanism by which GC reduce GR expression in hippocampus was unknown in the XX Century.

Questions established in the XXI Century. A number of research articles published in the XXI Century reporting information about the epigenetic mechanism involved in the hippocampal reduction of GR are selected and presented. The main epigenetic mechanisms known up to date are also mentioned.

Finally, the great therapeutic possibilities of the epigenetic mechanisms in the near future are enunciated as well as the possible explanation of evolutionary processes.

Keywords: Allostasis; gestational period; HPA axis; epigenetic programming; Darwin.

1. INTRODUCCIÓN

El concepto de allostasis, establecido a finales del siglo XX, recoge el conjunto de sistemas que se activan en los organismos vivos, regidos por el cerebro, para conservar el equilibrio interno y, por tanto, la supervivencia. Todo ello cuando factores externos al organismo, o internos a él, alteran su homeostasis provocando un estado de emergencia. Los factores internos que producen el desequilibrio pueden ser un aumento de pH, de temperatura, una infección, etc., y los externos pueden ser una alteración climática, falta de comida, o un depredador que nos ataca. Y todas las respuestas que los organismos habilitan, con fines de

supervivencia, se han englobado hoy en el concepto de allostasis y se ha mostrado que están dirigidos y modulados a nivel cerebral (1). Los principales sistemas que el organismo activa son los siguientes:

- El metabolismo o balance energético.
- Se activa el axis HPA con salida masiva a plasma de glucocorticoides.
- Aumenta el estrés oxidativo.
- Se deprime el sistema inmune.
- Se alteran procesos cognitivos o emocionales por la remodelación de estructuras hipocampales en colaboración con la amígdala.
- Alteraciones del sueño.

Son movilizados a nivel cerebral. Pero, siendo todos muy importantes, el que ocupa un lugar central es la activación del axis hipotálamo -hipófisis- corteza suprarrenal (axis HPA en la bibliografía científica anglosajona), con la consiguiente salida a plasma de niveles altos de glucocorticoides. Cuestión ya denunciada por Selye en 1936 cuando habló del *síndrome general de adaptación* en un estado de emergencia o estrés, término, este último, también acuñado por él (2).

Y todo este concepto de allostasis, recientemente establecido, tiene resonancias darwinianas y ha sido considerado así por diversos autores, algunos tan significativos como Mc Ewen (3).

Estamos queriendo destacar pues, que cuando Charles Darwin en el siglo XIX escribió con su gran inteligencia y dotes de observación, el Origen de las Especies, y estableció que la evolución se producía por una *selección natural*, no existía ningún conocimiento, en los seres vivos, ni a nivel fisiológico, ni a nivel molecular, para realizar y explicar dicha selección natural.

En el siglo XXI comenzamos a vislumbrar mecanismos, recientemente establecidos, con los cuales se podría realizar esa selección natural que tan creativamente concibió Darwin en el siglo XIX.

2. TRABAJOS DEL SIGLO XX

Por trabajos realizados en el siglo XX, se estableció que el axis HPA se programa en periodo gestante en los mamíferos. Y que la malnutrición materna, el estrés de la madre, o ciertos desequilibrios hormonales de ella pueden ser la causa de una programación anómala del axis en periodo fetal y con consecuencias patológicas posteriores en periodo adulto (4,5).

Las principales cuestiones establecidas durante el siglo XX, fueron:

- El eje HPA se programa durante la gestación de forma irreversible en periodo adulto.
- La malnutrición de la madre gestante, su estrés psico-social o una infección; activan el eje HPA materno y pasan cantidades grandes de glucocorticoides de la madre al feto que retardan su crecimiento y programan mal su eje HPA.
- Tanto los niños nacidos pequeños así como un eje programado de forma anómala son un factor de riesgo de padecer en adulto las patologías comprendidas dentro del síndrome metabólico.
- El denominador común de dichas alteraciones-retardo de crecimiento fetal y mala programación del eje- parece ser la llegada en grandes cantidades de glucocorticoides al feto.

Estas patologías posteriores de adulto son las comprendidas en el llamado síndrome metabólico, es decir, alteraciones cardiovasculares, diabetes 2 e hipertensión, y todas ellas son, además, muy frecuentes en las sociedades actuales.

Por otra parte, estudios clínicos de estas patologías así como estudios epidemiológicos en humano (6-8) han mostrado que una mala programación de dicho eje acompaña, en periodo adulto, a la manifestación de dichas patologías.

Pero, además, estudios epidemiológicos en humano (9,10) mostraron que los neonatos pequeños al nacimiento, los que son pequeños para su edad gestacional (llamados niños SAG o *small for gestational age* en la literatura anglosajona) sin ninguna causa que lo justifique son un factor de riesgo para padecer en adulto las mismas patologías comprendidas en el síndrome metabólico anteriormente descritas y esos niños se conoce y se ha establecido que tienen un eje HPA programado de forma anómala. Pero no son factor de dicho riesgo los niños nacidos pequeños porque sean prematuros niños AGA -*appropriate for their gestational age*- ni tampoco los niños nacidos pequeños por causas conocidas llamados en el mundo anglosajón niños IUGR (*intrauterine growth retardation*). Todo ello fue absolutamente establecido en el siglo XX por estudios epidemiológicos en humano, así como por investigaciones básicas de eminentes investigadores como Hales, Barker o Gluckman (10-13).

Pero, antes de seguir adelante y adentrarnos en las investigaciones sobre esta temática en el siglo XXI, cabe preguntarse en que consiste esta programación anómala del eje hipotálamo -hipófisis - adrenal (HPA).

Un eje HPA anómalo es aquel en el cual la retroalimentación negativa que las hormonas periféricas ejercen, en este caso corticoides, a nivel de hipotálamo y a nivel de hipófisis, se realiza mal. Y en ese caso hay una exagerada producción de hormonas periféricas, corticoides circulantes, en el HPA. Esta programación anómala fetal se produce cuando por malnutrición, estrés psicosocial o

desequilibrios hormonales de la madre gestante pasan al feto masivamente corticoides maternos.

Todos los axis endocrinos funcionan igual. Las hormonas hipotalámicas descienden por el sistema porta a la hipófisis y ésta, a su vez, envía a las glándulas periféricas la correspondiente hormona hipofisaria que, finalmente, estimula en la glándula periférica la hormona: gonadal, tiroidea o adrenal, según consideremos axis gonadal, tiroideo o HPA. Por ello, en todos los axis endocrinos es muy necesario dicho taponamiento o retroalimentación negativa a nivel hipotalámico e hipofisario para que el axis no funcione desmedidamente y suban de forma continuada y exagerada los niveles de hormonas gonadales, tiroideos o adrenales en plasma (figura 1).

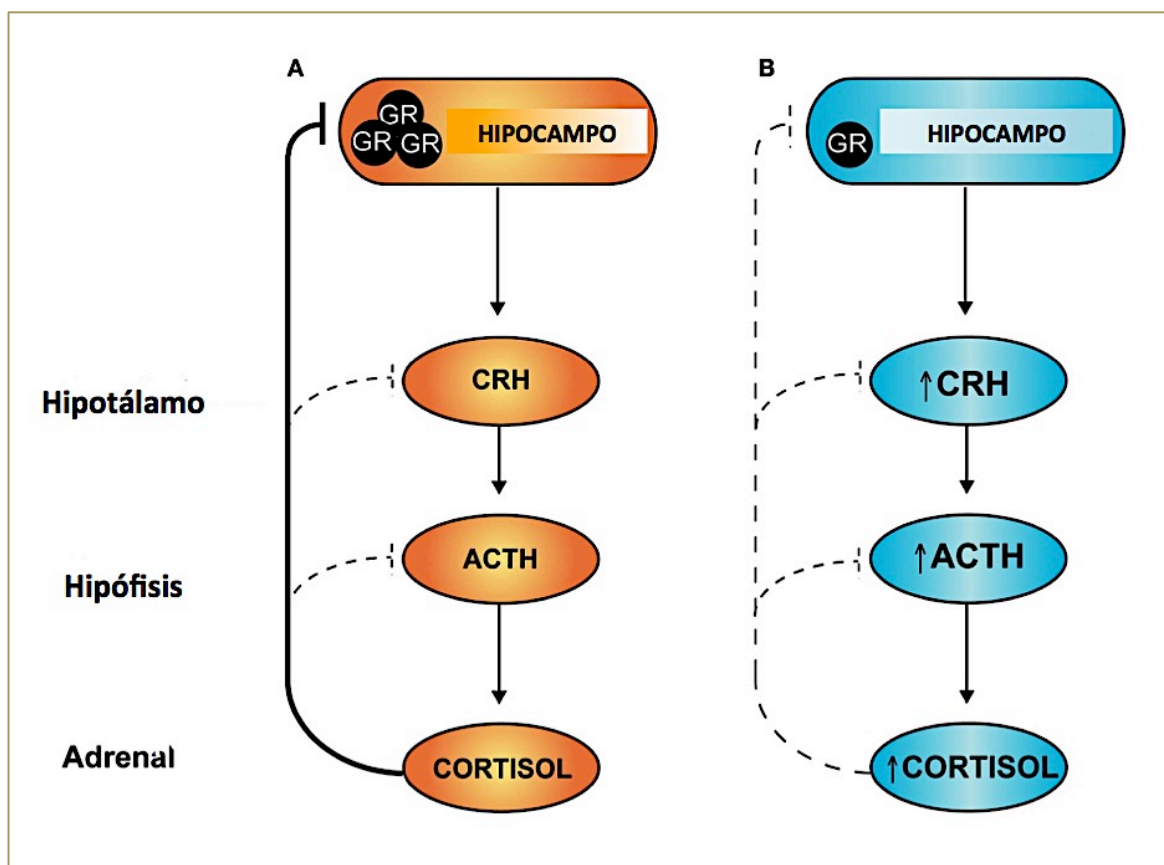


Figura 1.- Programación prenatal: A) axis bien programado con muchos receptores de glucocorticoides GR en hipocampo. B) axis anómalo con escasez de GR en hipocampo ver texto HPA (hipotálamo-pituitaria-adrenal).Esquema modificado de referencia (23).

Pero ello es muy importante en el axis HPA, ya que existe una gran cantidad de receptores de hormonas adrenales en órganos vitales del organismo: páncreas, hígado, sistema esquelético etc. y, ello podría tener efectos devastadores para el organismo. Las conclusiones de las investigaciones sobre esta temática durante el siglo XX establecieron, como se muestra en la figura1A, que un axis HPA bien programado es el que tiene cantidades grandes de receptores de corticoides GR, de cortisol en humano, en su hipocampo. Mientras un axis mal programado es el que

tiene (figura 1B) escasez de receptores GR hipocampales, porque también se estableció en el siglo XX, que los receptores hipocampales tienen una acción tónica muy importante en la regulación del eje HPA, regulando la descrita retroalimentación negativa.

En la figura 2 puede verse cómo y porqué se programa de forma anómala el eje HPA según los conocimientos actuales.

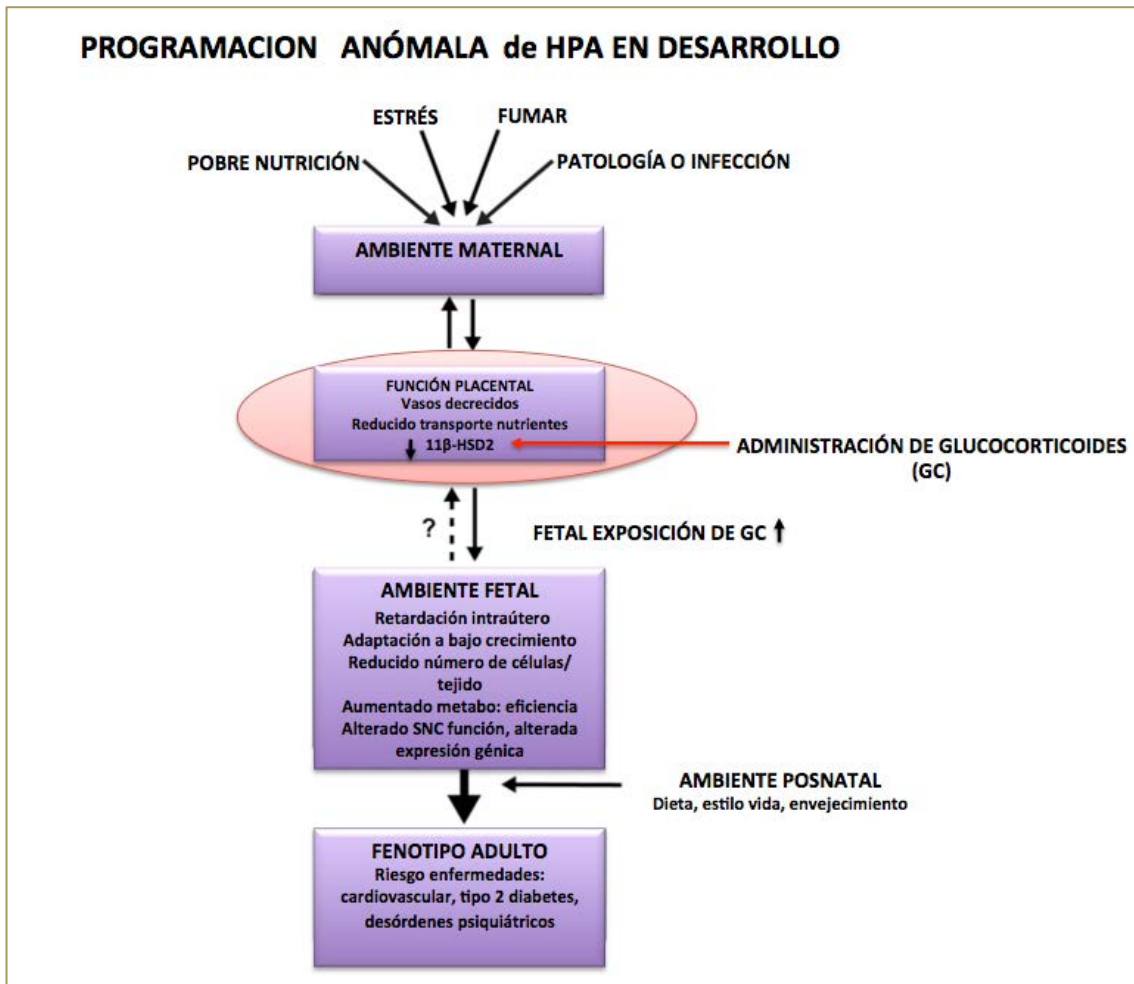


Figura 2.- Estrés, fumar, malnutrición materna, activan el eje HPA de la madre gestante. Cantidad de glucocorticoides (GC) maternos modifican el ambiente placentar: vasos de menor calibre, poco paso de nutrientes, reducida secreción de actividad enzimática 11βHSD-2 que inactiva los GC maternos en placenta. Todo ello, altera el ambiente fetal: bajo crecimiento, adaptación a malas condiciones, alteración de SNC y finalmente alteraciones genéticas, como veremos. Lo mismo se produce por administración masiva de glucocorticoides a la madre que pasarán a la placenta, parte central de la gráfica. Ello producirá un fenotipo adulto con riesgo de enfermedades cuya aparición depende del estilo de vida del adulto, de su ambiente postnatal Esquema remodelado de referencia (23). Modificada de Cottrell, C. and Seckl, J. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3: 1 – 9. 2009.

¿Pero cómo lo hacen?, ¿por qué mecanismo la llegada masiva de glucocorticoides maternos disminuye los correspondientes receptores en el hipocampo en periodo fetal ?

Y todo ello, dado el interés clínico de la cuestión, ha sido abordado e investigado durante el siglo XXI.

3. TRABAJOS REALIZADOS EN EL SIGLO XXI

A partir de 2004 -2005 comenzaron a publicarse muchos trabajos sobre esta temática bajo la luz de los conocimientos actuales y por la presión clínica que supone el hecho de que las patologías comprendidas en el síndrome metabólico se manifiestan con enorme frecuencia en las sociedades actuales.

Así pues, se reemprendió el estudio de la programación del axis HPA en periodos gestacionales ya que estaba claro que las causas de malnutrición o desequilibrios hormonales de la madre gestante tienen como denominador común la llegada masiva de glucocorticoides de la madre al feto, y como consecuencia se produce un mal crecimiento fetal. Pero, además, los estudios neonatológicos sobre el desarrollo de mamíferos muestran que durante la gestación el 80% de los glucocorticoides fetales son de origen maternal ya que hasta el final de ella el axis HPA fetal no es funcional. Sin embargo, al final de la gestación este axis fetal funciona activamente ya que los glucocorticoides fetales son necesarios para la preparación del parto y para estimular y finalizar la gran maduración y diferenciación de órganos fetales que van a ser imprescindibles al neonato en su vida extrauterina.

Para describir el nivel de conocimiento a que hemos llegado actualmente, en esta vertiente temática, en primer lugar, vamos a hablar de los trabajos publicados en 2013 por departamentos de obstetricia, y sus correspondientes grupos de investigación de Berlín, Australia y Canadá (14). Estos autores, partiendo de una visión fisiológica del tema estudian *in vivo e in vitro*, con tecnologías y conocimientos actuales, las causas y circunstancias por las cuales la malnutrición materna o su estrés psicosocial y sus desequilibrios hormonales provocan la programación de forma anómala del axis HPA, en los mamíferos, durante el periodo fetal. Todo ello debido a que dichas situaciones producen en la madre gestante una subida de los glucocorticoides maternos, por la activación de su propio axis HPA ante esas situaciones de emergencia, y esos glucocorticoides maternos pasan al feto, como ocurre, también en el caso de hiperinsulinemia maternal por diabetes gestacional (figura 3).

Estos autores, además, están motivados en sus investigaciones por su conocimiento de que en la clínica se siguen utilizando la dexametasona y la betametasona para la prevención de partos prematuros o en casos de asma maternal (15), así como por la sospecha de una hiperplasia adrenal congénita en los fetos hembra. Y, además, existen publicaciones que denuncian alteraciones cognitivas de aprendizaje y problemas de conducta, en niños cuya madre fue

tratada con dichos glucocorticoides de síntesis en su gestación (16).

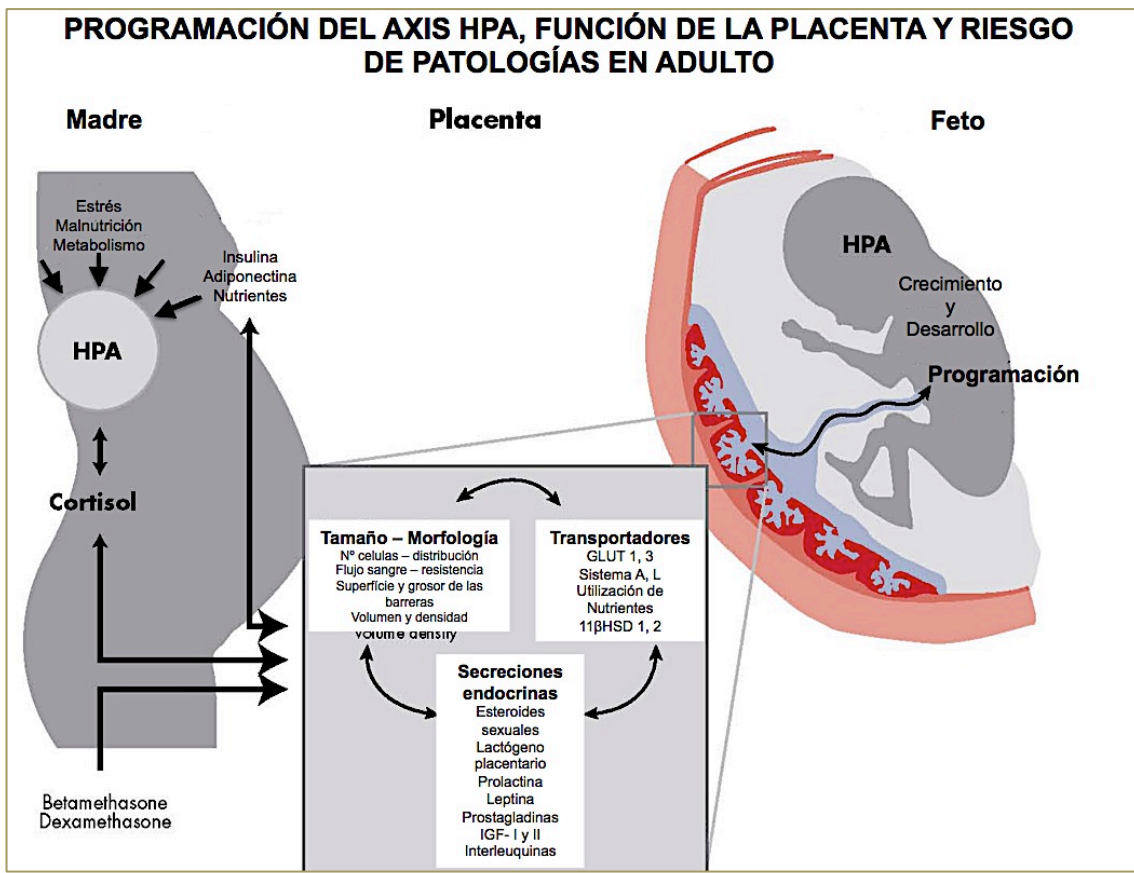


Figura 3.- Condiciones de estrés materno activan el HPA de la madre. El cortisol materno pasa a placenta y altera la morfología y el tamaño placentar. Se modifican y reducen las secreciones en placenta que son muchas y todas dedicadas al crecimiento del feto. En placenta y en tejidos fetales hay desde el principio de la gestación cantidades de receptores de glucocorticoides GR. Modificada de referencia (14).

En este estudio utilizan un modelo en oveja *in vivo* (figura 4). La oveja nace más madura que el hombre en cuanto a su SNC, pero su corticoide fisiológico es el cortisol como en el hombre y no la corticosterona como en las ratas, por ello consideran la oveja muy adecuada para estos estudios.

En sus conclusiones, establecen que un subóptimo ambiente fetal está totalmente asociado a riesgo de patologías del síndrome metabólico: hipertensión, diabetes 2, obesidad y alteraciones cardiovasculares, además de peso reducido al nacimiento en los SAG –niños con pequeño peso para su edad gestacional –, como hemos dicho. Constatan que al final de la gestación existe, en todas las especies de mamíferos, una elevación en hipotálamo del mRNA de CRH –hormona corticotropa hipotalámica- y cuando se activa el axis HPA el mRNA de la molécula POMC (proopiomelanocortina) aumenta en hipófisis, ya que es la POMC la molécula de que deriva el ACTH, hormona hipofisaria corticotropa. A su vez, la llegada de ACTH a la corteza adrenal supone el aumento de secreción de cortisol en humano y en oveja en la corteza adrenal.

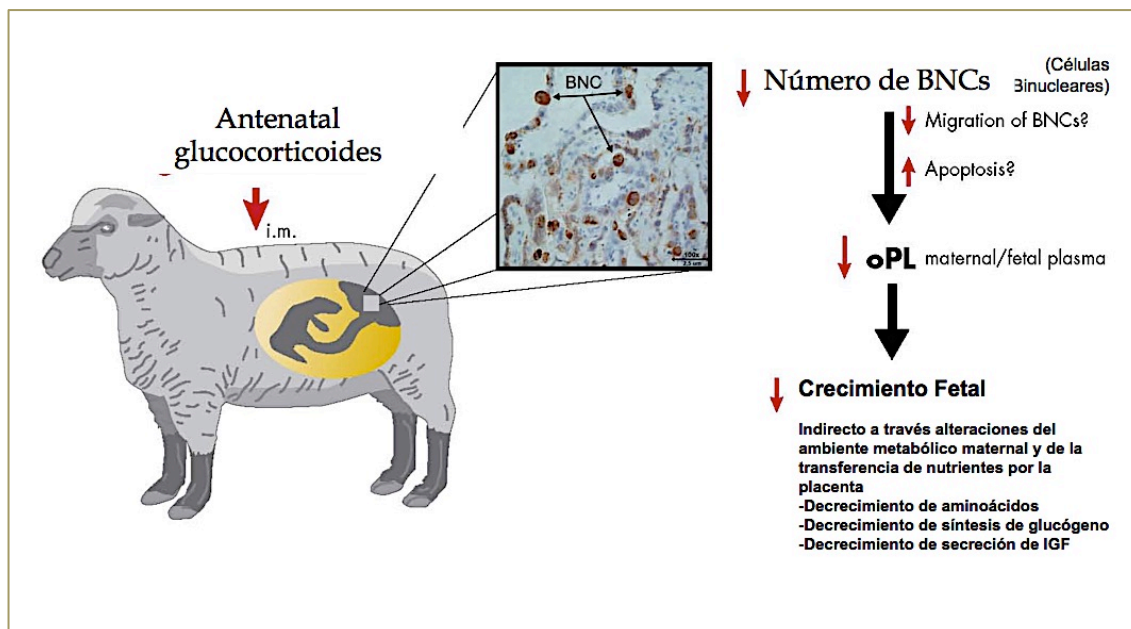


Figura 4.- Efecto del tratamiento prenatal con glucocorticoides en oveja. Inyección *in vivo* de cortisol, por vía intraperitoneal, a una oveja gestante donde se destacan las grandes alteraciones en la estructura placentaria y como consecuencia la reducción de la secreción de lactógeno placentario (PL) por disminución de células binucleares BNC –estudio histológico en el centro.–que son las que secretan PL. Modificada de referencia (14).

Estos autores señalan que es la llegada masiva de glucocorticoides maternos al feto lo que produce una programación anómala del axis HPA y también restricción de crecimiento en los fetos en los SAG, como hemos dicho. Son los glucocorticoides maternos en altos niveles los que por una parte programan mal el HPA y por otra producen una mala diferenciación de órganos y sistemas que llevaron a Hales en 2001 a lanzar la hipótesis del *fenotipo ahorrativo* en periodo adulto (6,10,11). Y el resultado de la llegada de altos niveles maternos de glucocorticoides al feto depende de la clase de glucocorticoide y del periodo gestacional en el que se produce.

En ese artículo se destaca grandemente la importancia de la placenta en estas cuestiones y, en general, para la regulación del crecimiento fetal (figura 3). Porque la placenta no es un mero órgano para transportar nutrientes, es una glándula secretora. En la placenta se secretan hormonas con estructura polipeptídica parecida a las hormonas hipotalámicas, y también hormonas, glicoproteínas, parecidas a las hormonas hipofisarias, como el lactógeno placentario (PL). Las células placentarias, los *trofoblastos*, fundamentalmente los *sintiotrofoblastos* tienen todas las características de células secretoras (17) También se expresan en la placenta transportadores de glucosa como el Clut 1 y 3 y se secreta la actividad enzimática 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa 2 (11 β -HSD-2), actividad capital para regular el paso de glucocorticoides activos al feto desde la madre (figura 3). Esta actividad es una barrera placentaria para inactivar los glucocorticoides activos a inactivos es una deshidrogenasa. Y existe

una correlación positiva entre el peso fetal y dicha actividad enzimática en placenta y en tejidos fetales (4).

La placenta también secreta el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) que es considerado la hormona de crecimiento fetal. Existe una correlación positiva muy alta entre los niveles fetales de IGF-1 y el crecimiento fetal. En nuestro grupo de trabajo fue un tema muy estudiado (18-20)

Realmente, se puede decir que la placenta representa la unión del feto con el medio exterior y es capaz, por sus secreciones y por propiciar la llegada de nutrientes, de suplir al organismo fetal y regular su crecimiento en cuestiones que después del nacimiento harán los órganos ya formados del neonato, como riñones, pulmones, glándulas endocrinas y tracto gastrointestinal neonatal. La placenta, de muchas formas, modula el ambiente de crecimiento del feto. y su homeostasis.

Estos autores destacan en su trabajo la necesidad de ahondar en el estudio placentar (figura 4).

En su modelo de oveja, inyectan intraperitonealmente *in vivo* a la madre gestante glucocorticoides (figura 4) y observan elevación de la presión arterial en la madre y la restricción del crecimiento en el feto, además de modificaciones en la regulación de su axis HPA, con alteraciones de la tolerancia a la glucosa en su etapa adulta. Aducen que ello ha sido probado en macacos, ovejas, ratas y humanos, y que todo ello llevó a la creación en 2003, en el Reino Unido, de la Sociedad Internacional durante el Desarrollo de la Salud y la Enfermedad-*International Society for the Developmental Origin of Health and Disease ((DOHaD)* (10).

En su trabajo resaltan el hecho de que a pesar de que durante el periodo gestante de los mamíferos el glucocorticoide circulante es de origen maternal, y sus niveles no son altos, ya que, solamente, al fin de la gestación se produce una gran elevación de glucocorticoides circulantes en el feto debido al funcionamiento del axis fetal (figuras 3 y 4). Sin embargo, durante toda la gestación existe una gran cantidad de receptores de glucocorticoides tanto en la placenta como en los tejidos fetales desde el principio hasta el fin del periodo gestacional. Hoy se sabe que los *knock out*, los animales que no expresan dichos receptores GR por manipulación genética, no crecen, no prosperan, y los transgénicos en los que se reduce el 30-50 por cien los GR tienen un axis HPA mal programado. En su trabajo destacan, en sus experimentos *in vivo* inyectando glucocorticoides a la oveja (figura 4), cómo la llegada de corticoides a la placenta, por una parte, modifica y desestructura la formación de tejidos y capas celulares placentarias y, por otra, disminuyen en placenta, secreciones como el lactógeno placentario (PL). El PL tiene, además, acciones en la madre gestante adaptando su metabolismo para que disponga de nutrientes. Y, en placenta estimula la secreción de IGF-I que, como hemos dicho, es la hormona de crecimiento fetal. El PL es somatotropo; estimula la

toma de aminoácidos por la placenta y también la síntesis de glucógeno.

Pero el lactógeno placentario es producido en la placenta por células placentarias, *trofoblastos binucleados*, llamadas células BNC, y el número de ellas sube al final de la gestación. Sin embargo, la llegada masiva de glucocorticoides maternos a la placenta baja el número de BNC y remodela de forma anómala las capas celulares placentarias (figura 4) (14). Todo lo cual indica que la llegada de glucocorticoides maternos a la placenta, en grandes cantidades, tendrá como resultado, por una parte, una mala adaptación metabólica maternal, que impedirá que disponga la madre de los nutrientes necesarios para el feto por la disminución de secreción placentaria PL, y, por otra parte, disminuirá la secreción del IGF-I placentario que es estimulada en la placenta por dicha secreción PL, todo lo cual tendrá como consecuencia la disminución del crecimiento fetal. Por ello, estos autores remarcan, con sus resultados, el interés de aumentar las investigaciones placentarias en curso.

También en la placenta se secreta el CRH –hormona hipotalámica del axis HPA- la cual es regulada al alza por el cortisol y las citoquinas, y tiene acciones sobre el miometrio (14). Es un vasodilatador aumentando el paso de nutrientes por la placenta y tiene acciones en la amígdala porque existen sus receptores en ella. Por ello, creen que el aumento en la placenta de CRH, por la llegada de glucocorticoides, parece implicar al CRH en las alteraciones emocionales que presentaran posteriormente los niños con axis HPA mal programado en etapa fetal (14), ya que la amígdala, en los mamíferos, controla las emociones y se le ha llamado *cerebro emocional*

Hay que remarcar antes de seguir adelante las grandes aportaciones de los autores de este trabajo a esta temática. Trabajos realizados, además, desde una perspectiva fisiológica y muchas veces clínica (21,22)

La concepción actual de cómo y de qué forma se programa de forma anómala el axis HPA en los mamíferos viene expuesta y explicada en la figura 2 (23).

Hoy se sabe que los receptores de glucocorticoides GR se codifican en el exón 2-9 del promotor de GR y que la llegada masiva de glucocorticoides baja los GR en el hipocampo, pero la gran pregunta es: ¿por qué mecanismo? ¿cómo lo hacen?

Para contestar a estas cuestiones y muchas otras, ya en el siglo XX se enunció y se comenzó a hablar de la epigenesis, cuyos principales logros, fueron:

- 1939 Waddington. “La epigenesis son las interacciones causales entre los genes y sus productos de los cuales resulta el fenotipo”.
- 1995 Razin A., Shemer R. DNA methylation in early development. Hum. Mol. Genet. 4:1751 -1755.

- 1998 Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing: three way connection. *Embo.Journal* 17:4905-08.
- 1980 Razin A. DNA methylation and gene function. *Science* 210: 604-610.

4. EPIGÉNESIS

Waddington en 1939 definió *la epigénesis como las interacciones causales entre los genes y sus productos de los cuales resulta el fenotipo*. Y se publicaron importantes trabajos que aportaron un cúmulo de conocimientos sobre el tema (24-27).

Pero nosotros nos vamos a referir a los trabajos, absolutamente remarcables y rigurosos, del grupo de Michel Meaney en la Universidad Mc. Gill, en Montreal, Canadá, publicados ya en el siglo XXI, por la gran cantidad de conocimiento que han aportado tanto en sus trabajos del 2004 como los publicados en 2008 (28,29).

El Dr. Michell Meaney es Profesor de Medicina de Douglas Hospital Research Centre de la Universidad Mc Gill en Montreal, una de las más prestigiosas universidades de Canadá, y ha sido Director del Proyecto sobre “Neurodesarrollo, Vulnerabilidad y Adversidad Maternal”.

Ya en el año 2000 (30) dicho grupo observó que había dos tipos de comportamiento de la madre en las camadas de rata. Existen madres que se comportan con cariño y con mimos y ayudan en la lactancia a sus crías con lamidas, etc., mientras otras rechazan a sus neonatos y los arrojan con patadas y sin ninguna caricia. Pero estos autores dejaron crecer hasta adulto a las crías procedentes de ambos tipos de madres y observaron que las ratas más mimadas por su madre eran más aptas, en periodo adulto, para el aprendizaje de cuestiones regidas a nivel de hipocampo como son los aprendizajes con un componente espacial (5). Entonces midieron la expresión de factores neurotróficos en dicho órgano y la activación de determinados receptores en el hipocampo y concluyeron que los animales que fueron cuidados por su madre tienen activada la sinaptogénesis hipocampal.

En el año 2004 publicado en *Nature Neuroscience* (28) estudian, en este mismo modelo, el hecho de que los descendientes adultos de madres *cuidadoras* tienen un axis HPA bien regulado y no presentan, desde su nacimiento hasta el estadio adulto, cuadros de ansiedad ante el estrés. Mientras que sucede lo contrario en los descendientes de madre *poco cuidadoras*. Pero para que, entre ambas situaciones, haya dicha diferencia tiene que haberla en la programación del axis HPA. Imaginan que, quizá, el cuidado materno en la edad temprana, ha alterado el número de receptores de glucocorticoides (GR) en su hipocampo.

Piensen que las caricias maternas han aumentado el número de receptores.

Lo primero que abordan es esclarecer si puede haber alguna diferencia genética entre las crías de ambos tipos de camadas transmitida por vía maternal. Para ello cruzan a las doce horas del nacimiento crías de una camada con la otra (figura 5).

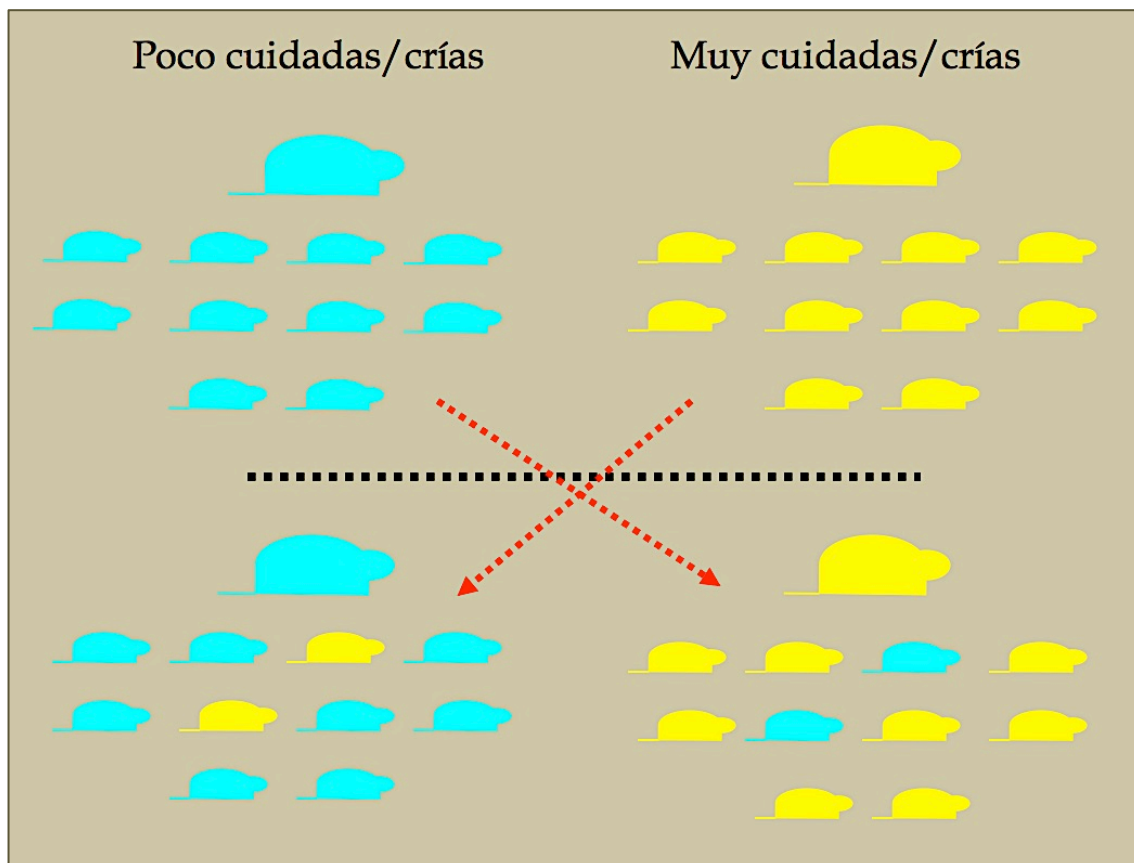


Figura 5.- Muestra de cómo a las 12 horas del nacimiento introducen crías de una camada en otra camada cuya madre se comporta de forma distinta, en periodo lactante, a su madre biológica. Comprueban que las diferencias encontradas en el funcionamiento del axis HPA y su comportamiento ante el estrés, es debido al trato recibido en la lactancia y no a ninguna transmisión genética hecha por su madre biológica. Gráfica sugerida y reformada de citas (28,29)

Introducen a las 12 horas del nacimiento crías nacidas de una madre en la otra, para que sean criadas en distintas condiciones en el periodo lactante. De esa forma comprueban que los adultos procedentes de una madre *cuidadora* se comportan todos igual en cuanto a su axis HPA y situaciones de estrés, teniendo un axis bien programado aunque, parte de ellos, hayan nacido de la madre arisca y, exactamente, lo mismo sucede con los criados por la madre *no cuidadora*. Descartando así, que la diferencia de programación del axis HPA fuera debida a alguna transmisión genética diferencial hecha por su madre biológica.

Estos autores basándose en conceptos epigenéticos, recientemente establecidos (figura 6) piensan que son los estímulos sensoriales de las caricias de la madre los que han producido una alteración química en dinucleótidos del ADN

en el gen que expresa receptores de glucocorticoides en el hipocampo.

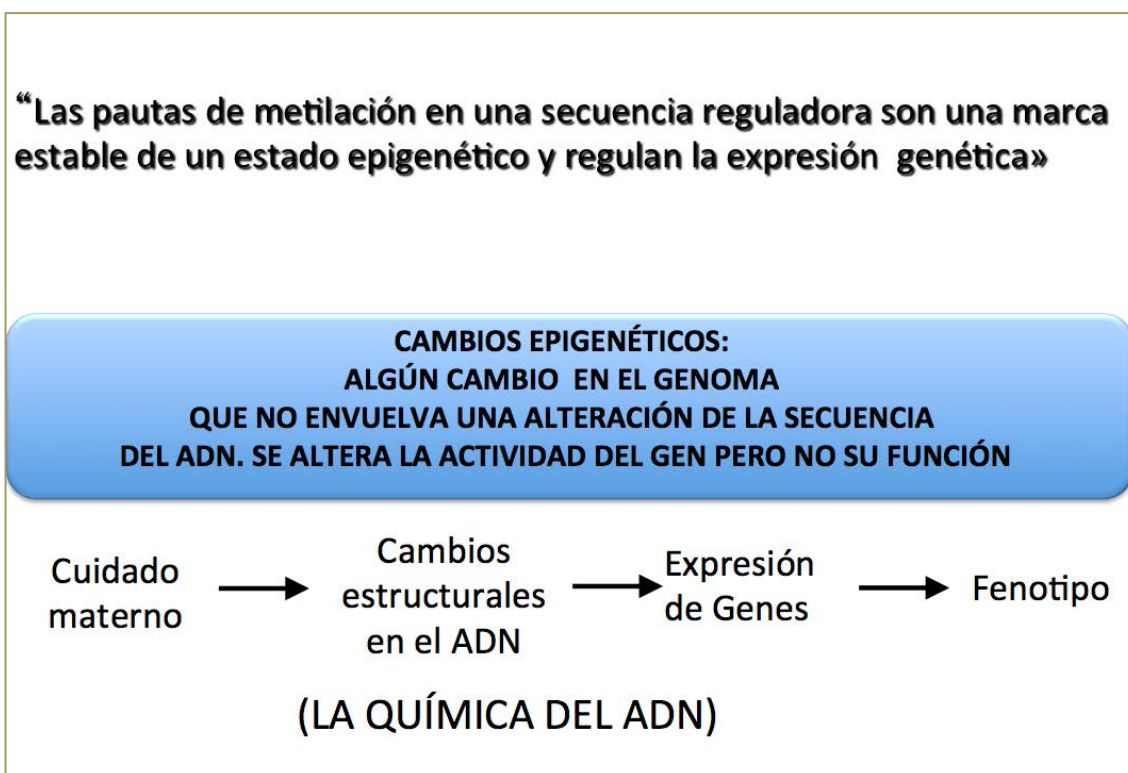


Figura 6.- En la parte superior: enunciado de cuestiones epigenéticas establecidas desde finales del siglo XX. En la parte inferior: hipótesis de trabajo de Meaney y colaboradores: las caricias de la madre lactante o las no caricias, parecen producir cambios estructurales en el ADN de determinados genes en sus crías, lo que llaman la química del ADN.

En trabajos anteriores del grupo de Meaney (31,32) habían concluido que solamente quince minutos de manoseo y caricias a las crías a partir de los seis primeros días de vida, durante aproximadamente dos semanas, aumentaba, permanentemente, los receptores de glucocorticoides hipocampales GR, lo que potenciaba la sensibilidad de la retroalimentación negativa en el axis HPA y bajaba, en trabajos *in vivo*, el nivel de glucocorticoides circulantes cuando se activa dicho axis. Es decir da como resultado un axis programado de forma normal. También, en trabajos por manoseo y caricias de ratas neonatales los primeros días de vida habían encontrado implicada en estas cuestiones a la serotonina y su receptor tipo 2 con la regulación de la expresión en hipocampo del receptor de glucocorticoides GR. pero siempre en presencia de hormonas tiroideas(33). Y todo ello había sido hallado *in vivo* en neuronas hipocampales neonatales y adultas por otros autores (34) Por último hoy también se sabe (14) que la dexametasona incrementa en el cerebro de rata el transportador de serotonina.

Con todos estos antecedentes ellos, *in vitro*, inducen la expresión en neuronas hipocampales de la expresión del receptor de GR con serotonina. La inducción de serotonina requiere la presencia de hormonas tiroideas (figura 7) que se elevan por el manoseo de las crías en ratas y cobayas (34).

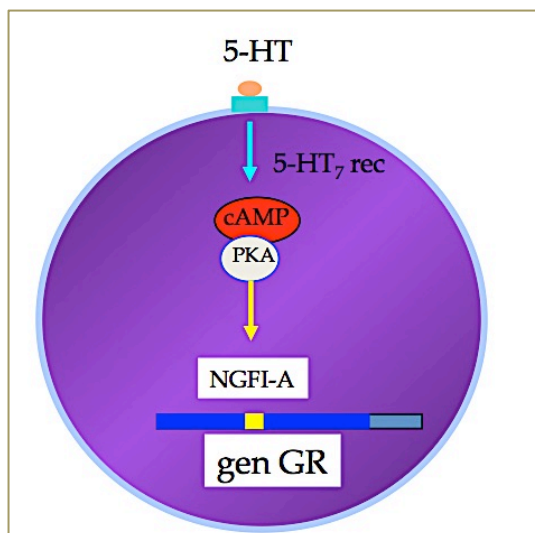


Figura 7.- Efecto *in vitro* de 5-HT sobre la expresión de GR en el cultivo de neuronas hipocámpales. El efecto de 5-HT es completamente bloqueado por inhibir la unión de NGFI-A. Esquema extraído y modificado de los trabajos *in vitro* del grupo de Meaney, referencias (28 y 30) que ratifican sus estudios *in vivo*. En cultivo de neuronas hipocámpales la introducción de serotonina (5-HT) induce un receptor de serotonina acoplado a c-AMP y sus asociadas protein quinasas (PKA) que reclutan un factor de transcripción NGFI-A el cual debe fijarse al gen que expresa receptores de glucocorticoides (GR) en el hipocampo para expresar o no expresar GR.

En esta activación serotoninérgica está implicado un subtipo de receptor serotoninérgico que actúa acoplado al cAMP y con las enzimas protein quinasas dependientes de cAMP (ácido adenosin monofosfórico). Por ello el efecto de la serotonina puede ser mimetizado por el cAMP o sus análogos.

In vivo, observan que el manoseo estimula el cAMP, el cual recluta un factor de transcripción específico el NGFI-A, factor de crecimiento nervioso inductor de proteína A, y también otro factor de transcripción el AP-2, los cuales se tienen que unir a la secuencia consenso del promotor del gen del receptor de glucocorticoides GR para que tenga lugar la transcripción y, por tanto, la expresión del gen del receptor de glucocorticoides con el consiguiente aumento de dichos receptores GR en el hipocampo (28).

Así que lo que ellos establecen es que las caricias de la madre rata ascienden por vía serotoninérgica desde el *nucleo raphe* cerebral, donde se segrega la serotonina, al hipocampo. La inducción de serotonina, para aumentar la transcripción en el promotor del gen que expresa receptores de GR, requiere la presencia de hormonas tiroideas y, en la acción serotoninérgica, actúa un subtipo de receptor de serotonina regulado por corticoides. Por ello la transcripción o no en el gen que expresa receptores de glucocorticoides depende de la fijación o no del factor de transcripción NGFI-A a su secuencia consenso en el promotor del gen de GR.

Estos investigadores supusieron que dicha fijación parece producirse de forma diferente en las crías procedentes de madres *cuidadoras* con respecto a las *no cuidadoras*, ya que son las crías de madre cuidadora las que parecen tener muchos receptores de glucocorticoides en el hipocampo por lo que funciona bien su axis HPA, incluso en periodo adulto, cosa que no sucede en los adultos que proceden de madre no cuidadora. Entonces, dados los conocimientos y axiomas establecidos por los estudios epigénéticos piensan que la fijación o no del factor de transcripción NGFI-A a su secuencia consenso en el promotor parece estar

regulada por estados epigenéticos distintos en ambas camadas. Creen que las caricias maternas producen alteraciones epigenéticas de tipo químico en la estructura del DNA del gen de GR pero sin cambiar la secuencia de sus dinucleótidos. Se basan en conocimientos establecidos en epigénesis, que posteriormente comentaremos, que se pueden resumir en el siguiente esquema y figura 8, donde se enuncian cuestiones epigenéticas hoy totalmente aceptadas:

1. ¿Metilación del ADN marca estable en la transcripción de un gen.?
2. Estructura cromática activa → Hipometilación de citosinas del dinucleótido CpG de regiones reguladoras de la expresión de un gen → activación transcripción.
3. Estructura cromática inactiva → Hipermetilación de citosinas del dinucleótido en CpG de regiones reguladoras de la expresión de un gen → inactivación de transcripción.

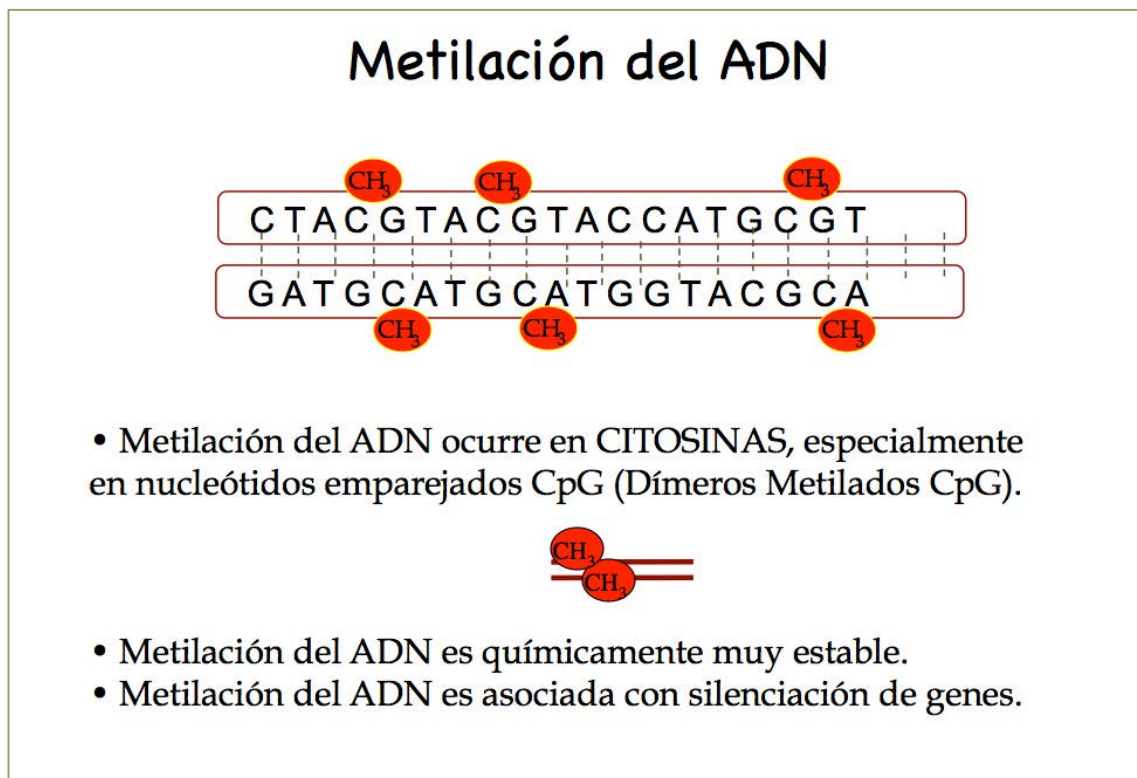


Figura 8.- Esquema de metilación del ADN extraído y modificado de citas (35 y 36). La metilación del ADN ocurre en el dinucleótido CpG (Citosina-guanina) La metilación está asociada con silenciamiento de genes.

La metilación del ADN es una marca estable, irreversible, de un gen se pone con interrogante porque está en discusión. Pero está completamente aceptado que la estructura cromática de un gen modula la metilación o no de su ADN. Si está activada la cromatina producirá hipometilación del ADN que finalmente activará la transcripción del gen. Si está desactivada producirá metilación del ADN y finalmente bloqueo de la transcripción del gen (figura 8).

Y partiendo de estos conceptos, y con el conocimiento de que la secuencia consenso donde se fija el factor de transcripción NGFI-A está en el exón 7 del promotor del gen de receptores de glucocorticoides (GR), mapean dicha región buscando una diferencia en ella con respecto a la metilación del dinucleótido CpG entre las crías procedentes de madre cuidadora y las procedentes de madre no cuidadora. Encuentran efectivamente que en dichas regiones está mucho más metilado el dinucleótido CpG en las crías procedentes de madre no cuidadora, con lo cual se silenciará dicha transcripción, y el gen de GR se expresará menos y por tanto habrá menos receptores de glucocorticoides en su hipocampo que en las crías hipometiladas que proceden de madre cuidadora.

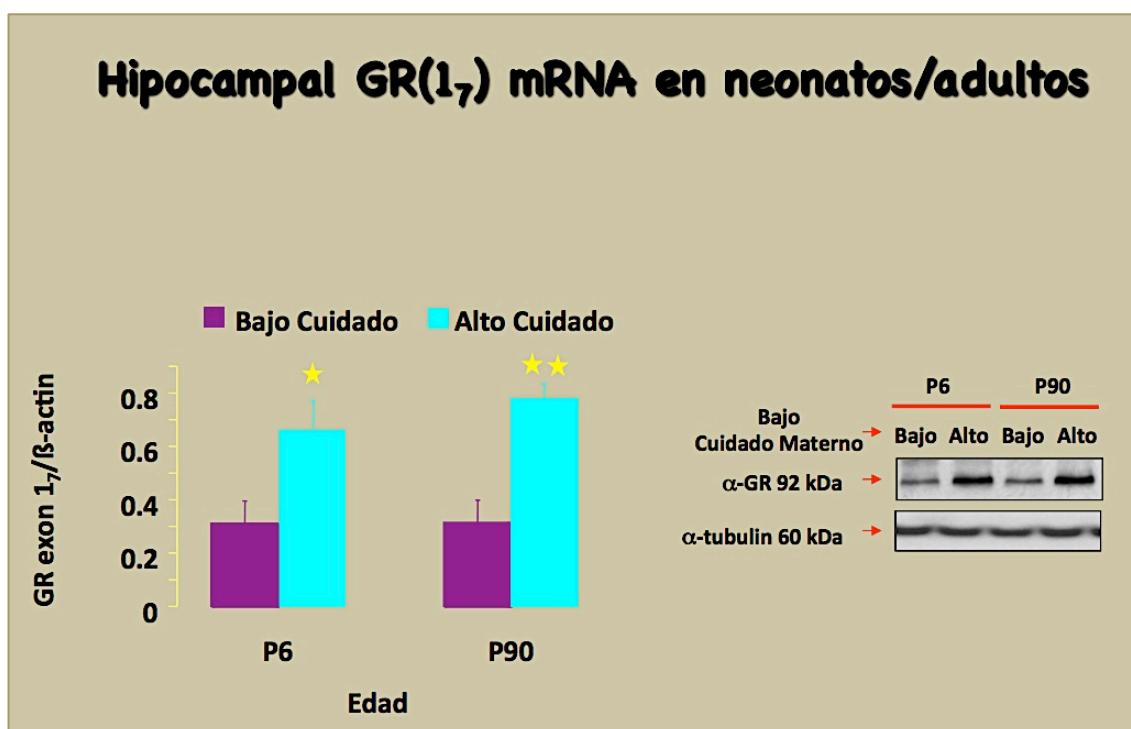


Figura 9.- Estudio de mRNA -ARN mensajero- del receptor hipocampal de crías procedentes de madre con bajo cuidado –prisma oscuro- y de alto cuidado –prisma verde – a la derecha se muestra la foto del análisis correspondiente. Siempre las crías procedentes de madre con bajo cuidado tienen, estadísticamente significativo, mucho más bajo el mRNA del receptor de glucocorticoides GR tanto a seis como a 90 días de vida en relación a las crías cuidadas. Modificada de citas (28, 29).

Así que mapearon diferencias de metilación de las citosinas en el dinucleótido CpG (citosina –guanina) en el exon7 del promotor de GR en el tejido hipocampal de las crías adultas procedentes de madre muy cuidadora y poco cuidadora en etapa neonatal. Lo hicieron utilizando bisulfito sódico y con un particular interés alrededor de la secuencia consenso del factor de transcripción NGFI-A. Encontraron que esa secuencia consenso esta siempre metilada en las crías que fueron poco cuidadas, y raramente lo está en las que fueron muy cuidadas. Los efectos del cuidado maternal incluyen neuronas y células gliales del hipocampo.

Pero para ratificar que efectivamente existen más receptores GR en el hipocampo de las crías cuidadas, ellos procedieron, en células de hipocampo, a medir la expresión del mRNA de los receptores GR de glucocorticoides en ambas crías procedentes de madre cuidadora o no cuidadora y lo hicieron a 6 o a 90 días de vida (figura 9) encontrando en ambas etapas de vida mucha más expresión de receptores GR en las crías procedentes de madre cuidadora.

5. SUCINTA RELACIÓN DE LOS CONOCIMIENTOS ACTUALES SOBRE LA MAQUINARIA EPIGENÉTICA

No es la intención de este trabajo, ni puede ser por razones de extensión, hacer una detallada reseña de los contenidos de la abrumadora cantidad de publicaciones que existen actualmente tratando de desentrañar y establecer conocimientos rigurosos acerca de la maquinaria epigenética. Esta gran cantidad y su interés científico están estimulados, en gran parte durante el siglo XXI, por el hecho clínico de las aberrantes metilaciones encontradas en el ADN de células de tumores cancerosos.

En los tejidos cercanos al tumor se encuentran células con sus genes muy metilados en las citosinas del dinucleótido CpG de su ADN, lo cual bloquea su transcripción. Pero se ha visto que esos genes si se expresaran, por no estar metilados, darían lugar a proteínas que impedirían la formación del tumor, o bien expresarían proteínas que bloquearían la angiogénesis alrededor de él. O sea, en ambos casos, de alguna manera, se podría detener el proceso canceroso.

Es por ello que esta vertiente de investigación, actualmente, ha sido muy estudiada buscando, en vertiente terapéutica, el bloqueo de enzimas que impidan la metilación, y todo ello está aportando cantidades enormes de conocimiento acerca de los procesos epigenéticos y su maquinaria.

Hoy podemos definir la epigénesis como el conjunto de alteraciones químicas capaces de actuar sobre el ADN activando la expresión o no del gen, pero sin alterar la secuencia de sus dinucleótidos.

En el esquema1, se sintetiza la principal maquinaria epigenética conocida (en la figura 8 se muestra donde se produce la metilación del ADN).

La cromatina compuesta de histonas es enormemente modulable por acetilación, metilación o fosforilización. A su vez el estado cromático modula la metilación del ADN del gen. De dicha metilación del gen depende su transcripción. Las acciones de RNA no codificantes son mucho menos conocidas.

La epigenética determina la accesibilidad a la maquinaria de transcripción de un gen tal como hemos expuesto anteriormente.

- **Modulación de cromatina: histonas**



Acetilación
Metilación
Fosforilización

- **Metilación ADN**

- **RNA no codificante**

Esquema 1. Maquinaria epigenética conocida.

En los genes, además del ADN, constituido por la secuencia de dinucleótidos, existe la cromatina.

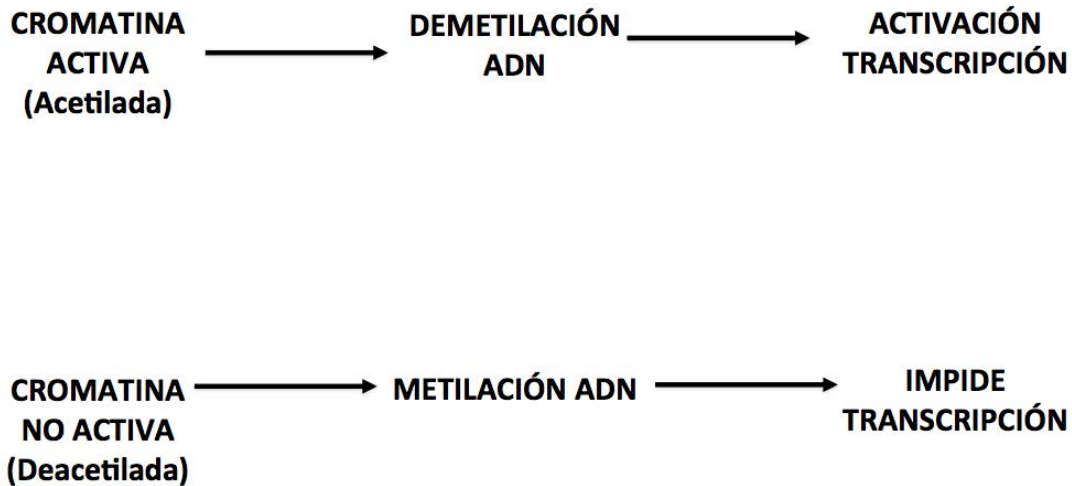
La cromatina es un complejo multiproteico muy dinámico que fue descubierto hace unos 130 años, pero las investigaciones sobre cromatina se reemprendieron hace unos 20-25 años (37). La construcción básica de la cromatina es el *nucleosoma* que está constituido por un octámero de histonas (38). Las histonas reparan el ADN y de alguna manera remodelan y activan los genes. En el gen el ADN se enrolla alrededor de los nucleosomas. Actualmente, se cree que las histonas modulan la metilación o no del ADN por un *código de histonas* no totalmente conocido.

La cromatina muy dinámica se modula por acetilación, metilación y fosforilización. Siendo esta última modulación la menos conocida.

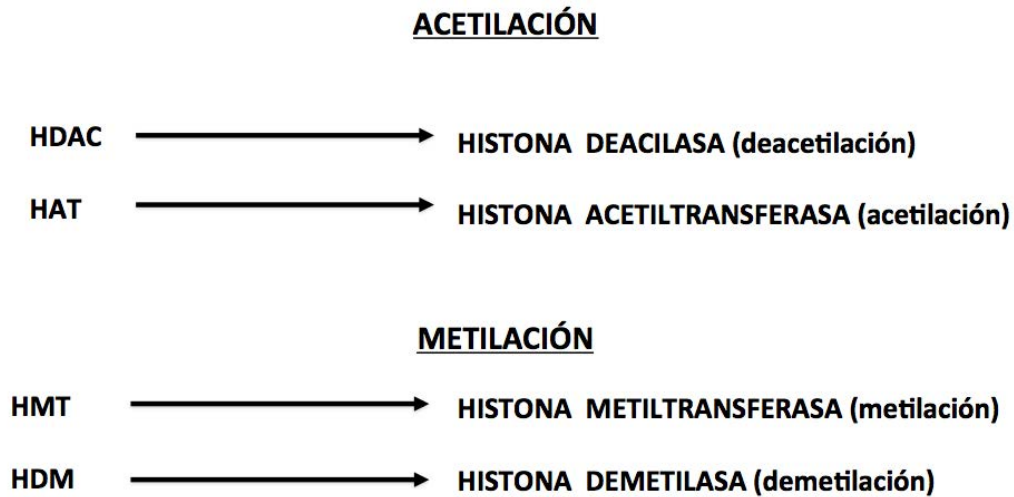
La acetilación da lugar a una cromatina activada que a su vez propende a una demetilación en el ADN y todo ello activa la transcripción. Sin embargo, la cromatina no activada, no acetilada, propende a la metilación del ADN y ello impide la transcripción del gen, según se muestra en el esquema 2.

La cromatina activada por acetilación propende a la demetilación del gen en su ADN. Ambas cosas se hacen reclutando las correspondientes enzimas histona acetil transferasa (HAT) para la cromatina y la ADN-demetilasa para la demetilación del ADN. La cromatina no activa, deacilada, propende a la metilación del ADN del gen utilizando respectivamente las enzimas histona deacilasa (HDAC) y ADN-metiltransferasa (DNMTs). La metilación del ADN se produce por reclutamiento de la enzima ADN metiltransferasa y la demetilación por la enzima ADN demetilasa. Las modulaciones de la cromatina se realizan reclutando las

correspondientes enzimas conocidas de las histonas, según lo mostrado en el esquema 3.



Esquema 2. Mecanismos epigenéticos.



Esquema 3. Acetilación y metilación de histonas.

La metilación del ADN silencia genes mediante dos mecanismos fundamentales: a) metilando en sitios críticos (Fig.8), que inhiben la unión de factores de transcripción a su secuencia consenso, tal como hemos expuesto en el anterior trabajo del Dr. Meaney, y b) reclutando proteínas unidas a grupos metilo, fundamentalmente S-adenosil metionina (SAM). Finalmente, la metilación silencia genes por bloquear su transcripción, tal como hemos expuesto anteriormente y a su vez desactiva la cromatina reclutando la enzima histona deacilasa (HDAC) produciendo un efecto o cambio parecido a un polimorfismo o a una ablación del gen tal como se sintetiza en el esquema 4.

Acciones de la metilación del ADN

- a) Silencia genes: inhibiendo la fijación de factores de transcripción a sus secuencias consenso.**
- b) Recluta proteínas unidas a metilo.**
- c) Silencia o inactiva la cromatina: reclutando la enzima histona desacetilasa (HDAC)**

Resultando un cambio parecido a un polimorfismo o a una ablación total del gen

Esquema 4. Acciones de metilación del ADN.

Pero existe una diferencia fundamental las alteraciones genéticas se producen en todas las células del organismo porque todas tienen el mismo ADN y son irreversibles, pero las alteraciones epigenéticas se producen solamente en determinadas células de determinados tejidos y como veremos parece que pueden revertirse.

Estableciéndose entre la activación de la cromatina (acetilación) y metilación del ADN un equilibrio bidireccional del cual hablaremos posteriormente.

Con todo lo expuesto, podemos concluir que actualmente existen cuestiones en epigenesis absolutamente establecidas y sintéticamente reseñadas en los esquemas anteriores (1-4; figuras 6, 8 y 10). El último mecanismo reseñado en el esquema 1, la existencia de mRNA no codificantes, se ha descubierto muy recientemente. Se ha estudiado sobre todo, en vertiente cancerígena. También se llaman micro RNA y parece que actúan degradando el mRNA (RNA mensajero), también, bloqueando la traslación, y silenciando, desactivando, la cromatina, aunque de ello se conoce poco.

Hay que señalar que como vamos a exponer más adelante, actualmente existe una controversia acerca de si, como se ha pensado durante más de 20 años, la metilación del ADN es realmente una marca estable o es reversible, y el mundo científico parece cada vez más inclinarse por la reversibilidad.

En la figura 10, se muestra el equilibrio metilación-demetilación de ADN respectivamente modulado por inactivación –activación de la cromatina.

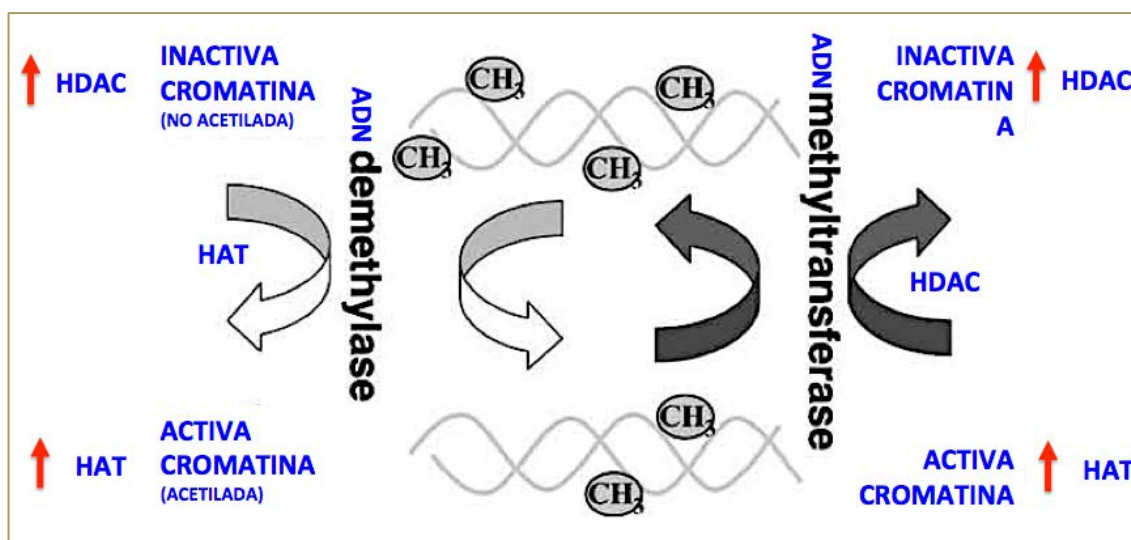


Figura 10.- Equilibrio metilación-demetilación de ADN respectivamente modulado por inactivación –activación de la cromatina. En la parte central, arriba, ADN metilado (muchos CH₃) y bajo demetilado (pocos CH₃). Parte izquierda: la demetilación del ADN, por ADN demetilasa, se produce cuando la cromatina está activada (flechas blancas). Parte derecha: la metilación del ADN, por la ADN metiltransferasa, se produce cuando la cromatina esta desactivada (flechas negras). La activación de la cromatina –acetilación- requiere la enzima histona acetil transferasa (HAT) y la desactivación –deacilación- la enzima histona deacilasa (HDAC). Estos equilibrios parecen ser bidireccionales. Modificado de cita (39).

6. POSIBLE REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA Y CONSIDERACIONES ACTUALES

En el año 2008 (29) el grupo de Meaney recoge y expone experiencias ya comenzadas en el 2004 (28), en las cuales tratan de averiguar, en el modelo descrito de camadas con madres cuidadoras o no, si la metilación o no metilación de las citosinas en el exón 7 del promotor del gen que expresa receptores de glucocorticoides (GR) que ellos habían encontrado, respectivamente, en las crías no cuidadas por su madre –metiladas- o en las muy cuidadas –demetiladas- son procesos reversibles o si no lo son.

Para ello dejan crecer a las crías de madre cuidadora y de madre no cuidadora hasta etapa adulta. Primero, comprueban que las primeras tienen un eje HPA-hipotálamo-pituitaria-adrenal- programado de forma ajustada y normal, mientras que no lo tienen las provenientes de madre no cuidadora. Ello supone que en las primeras se ha producido una demetilación alrededor de la secuencia consenso del promotor que a su vez ha aumentado la transcripción del gen, elevando, finalmente, el número de receptores de glucocorticoides en su hipocampo.

Para comprobar si dicha marca epigenética se puede revertir en periodo adulto, les suministran, por inyección cerebro-ventricular, S-adenosil metionina (SAM), el metil donador, y observan que su eje HPA responde entonces como el de las ratas provenientes de madre no cuidadora. Concluyen que se han metilado las citosinas en la secuencia consenso donde se fija el factor de transcripción con la

consiguiente disminución de la transcripción y la baja de receptores GR (parte izquierda de la figura 11).

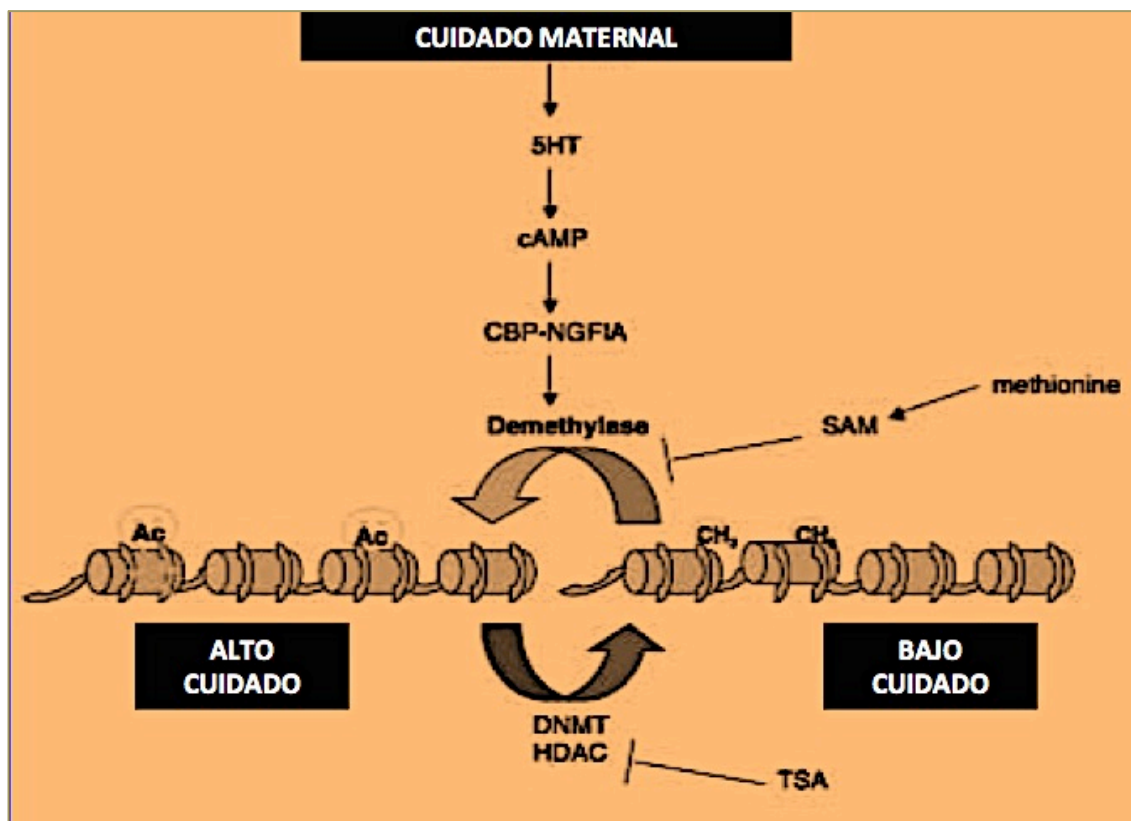


Figura 11.- Reprogramación epigenética. En la parte alta de la gráfica: el cuidado materno recluta serotonina (5-HT) que llega al hipocampo se fija a un receptor de serotonina acoplado a c-AMP y se actúa a través del factor de transcripción NGFI-A-(ver texto) Parte izquierda (alto cuidado): la fijación de NGFI-A a la secuencia consenso del promotor del gen de GR se produce más en las crías de madre de alto cuidado cuando se demetila allí el ADN por ADN demetilasa porque la cromatina está acetilada (Ac en gráfica). En parte derecha (bajo cuidado): el factor de transcripción NGFI-A se fija menos a su secuencia consenso porque se recluta ADN metiltransferasa que metila dicha secuencia (CH₃ en gráfica). Reprogramación: si en periodo adulto se inyecta por vía cerebroventricular, a las de alto cuidado materno, SAM (un metil donador) se metila el ADN en la secuencia consenso y los animales se comportan ante el estrés como las crías de bajo cuidado, por tener menor expresión final de GR. Y la reprogramación también ocurre en las de bajo cuidado si se inyecta TSA (un inhibidor de histonas deacetilasas HDAC) que activará la cromatina, la acetilará, como en las de alto cuidado, ello reclutará ADN demetilasa y se demetilará la secuencia consenso fijándose más el factor de transcripción como ocurriría con las de alto cuidado. Cosa que comprueban porque dichas ratas pasan a comportarse ante estrés como las de alto cuidado por aumentar en hipocampo los receptores de glucocorticoides GR. Gráfica reformada referencia(29). NGFI-A (factor de transcripción inductor de proteína A), c-AMP (ácido adenosin monofosfórico-) SAM- (S-adenosil metionina-) DNMT (ADN metil transferasa) TSA -inhibidor de histona deacetilasa (HDAC), GR(receptor de glucocorticoides) Ac (cromatina acetilada o activada), CH₃ (ADN metilado). Modificada desde citas (28,29).

Sin embargo, a las ratas adultas provenientes de madre no cuidadora que tienen un eje HPA mal programado por poseer metilada dicha secuencia consenso les dan inyección cerebro-ventricular de TSA (una droga inhibidora de la enzima histona deacetilasa (HDAC)), enzima que produce la deacetilación de la cromatina, y sin la cual la cromatina deacetilada piensa que se convertirá en cromatina activa

acetilada por faltar dicha enzima. En consecuencia, dicha modificación cromática a su vez demetilará la secuencia consenso, con el consiguiente aumento de la transcripción y, por tanto, del número de receptores de glucocorticoides en el hipocampo (parte derecha de la figura 11) Es decir se comportaran como las crías procedentes de madre muy cuidadora.

Y obtienen así, una reprogramación en periodo adulto del proceso epigenético provocado por las caricias, o por las no caricias, en periodo neonatal de ambas camadas.

Los resultados hallados en este trabajo muestran, además, experimentalmente, el equilibrio bidireccional, hoy totalmente establecido por los estudios sobre el cáncer (39), que parece existe entre modulación cromática, activando o no la cromátina por acetilación, y la demetilación o no del ADN del mismo gen (figura 10)

Pero en este trabajo (29) que ellos titulan “El Ambiente social y el epigenoma” expresan, además, toda una serie de sugerencias y conclusiones. Se hacen preguntas todavía no contestadas para incitar y hacer reflexiones proyectadas al futuro.

Comienzan por establecer que la atención sobre la metilación del ADN se focalizó, en principio, finales siglo XX, en el estudio de las pautas seguidas durante el desarrollo (25,27) y por ello se asentó el principio de que las marcas en el ADN durante el desarrollo permanecían estables (27), cuya creencia ha durado por espacio de veinte años. De la reprogramación que ellos consiguen en periodo adulto, que acabamos de exponer, deducen que las enzimas necesarias para las demetilaciones y metilaciones, en las ratas cuidadas o no cuidadas, se mantienen en etapa adulta, sin lo cual, dicen, no se podría producir la reversibilidad encontrada en dicho periodo. Afirman, pues, que actualmente se puede postular que la metilación del ADN puede producirse a lo largo de la vida y por tanto ello supone que se puede modular el genoma y afectar el fenotipo a lo largo de ella. Advierten y pronostican que si los cambios epigenéticos ocurren en células germinales entonces se transferirán a futuras generaciones.

Piensen que la maquinaria genética parece permanecer activa a través de la vida también en células postmitóticas. Prosiguen que hay pautas y señales, también en células maduras, que unen exposición extracelular a variaciones del ambiente y maquinaria genética, y para dicha aseveración aducen la reprogramación encontrada en sus camadas en el periodo adulto y también los trabajos de Miller y Sweatt en 2007 (40).

Estos autores muestran que los procesos de metilación–demetilación en el ADN de células hipocampales regulan procesos de aprendizajes adultos. Y, además, realizan sus experimentos provocando en las ratas situaciones de miedo. Con todo

ello, afirman que la metilación de ADN es dinámica en células postmitóticas en el cerebro y en neuronas in vitro (41). Y estos experimentos (40,41) son un modelo en el cual el factor ambiental que produce el cambio epigenético, no es químicos, sino un factor ambiental psicosocial, miedo, exactamente igual que las caricias maternas en los experimentos del grupo de Meaney (29).

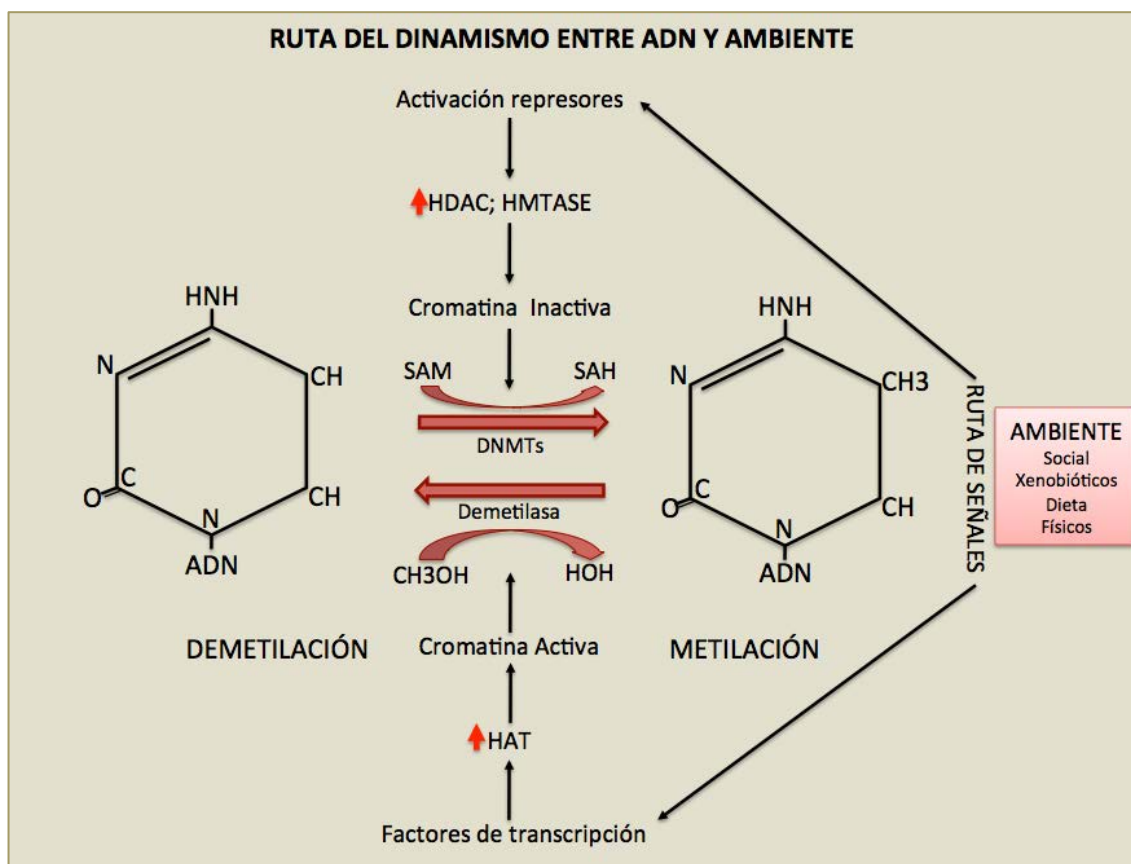


Figura 12.- Las señales exteriores que recibe el organismo por mal ambiente psicosocial, xenobióticos, malnutrición o físicos, pueden actuar como represores, o bien, actúan reclutando factores de transcripción que, finalmente, aumentarán la expresión de determinados genes. En la parte de arriba los represores, según los conocimientos actuales, reclutarán histona deacilasa (HDAC) en determinados genes de determinados tejidos, ello inactivará la cromatina de ellos, porque la deacilará, y como consecuencia se metilará el ADN de ese mismo gen, por acción de las ADN metil transferasas (DNMTs). La flecha horizontal, hacia la derecha, señala la metilación, en el carbono 5, de las citosinas del dinucleótido CpG. En la parte baja de la gráfica la señal actúa vía señales de factores de transcripción, y reclutará histona acetil transferasa (HAT) que activará la cromatina de determinados genes en determinados tejidos, que a través de demetilasas, demetilarán el ADN de esos mismos genes. La flecha horizontal, hacia la izquierda,, señala la demetilación de la citosina en el carbono 5, (CH₃OH pasa a HOH). También se señala la posible reprogramación de estos procesos en las flechas curvas: arriba,, dando SAM, metil donante, las citosinas parte izquierda DEMETILACION pasaran a METILACION parte derecha. En la parte baja la otra flecha curva señala la demetilación de la citosina de estado METILADO en el carbono 5 de la citosina CH₃OH a DEMETILADO CHOH - en la parte izquierda de la figura. Ello se hace dando un inhibidor, a las crías de madre cuidadora, de la enzima histona deacilasa (HDAC), el compuesto TSA, ver figura 11. Modificado de cita (29).

Por ello sugieren que una cosa importante a definir, en el futuro, es si los factores ambientales que pueden producir alteraciones epigenéticas son limitados

a factores de tipo químico como la dieta, drogas y toxinas o si una alteración de ambiente psicosocial también lo hace. Y ello es muy importante porque establece un vínculo entre ambiente psicosocial y salud. Otra cuestión es si las alteraciones epigenéticas pueden llegar a alterar la conducta, por ejemplo la de aprendizaje (40) y también si ello se produce solamente en el desarrollo, o también a lo largo de la vida.

Hoy la neuroepigénesis está en sus comienzos, pero se está investigando intensamente y, sin duda, se perfila como muy importante para poder establecer terapéuticas eficaces en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Finalmente, intentan, sucintamente, exponer en un cuadro, con los conocimientos actuales de la maquinaria epigenética y las enzimas respectivas conocidas, junto con los factores ambientales, cómo se articula la ruta de señales. Y establecen que las señales de los factores ambientales pueden actuar como represores o bien reclutar factores de transcripción, lo que da como resultado un bloqueo de la transcripción del gen o bien una buena transcripción de él, respectivamente (figura 12).

En la parte de arriba de la gráfica, una ruta de señales activa represores inactivando la cromatina de determinados genes, lo que provocará la metilación en su ADN que, a su vez, bloqueará la transcripción. En la parte de bajo dichas señales provocan una activación de la cromatina de los genes que a su vez producirá la demetilación del ADN que propicia la fijación a su secuencia consenso de factores de transcripción que aceleran la transcripción.

Hay que remarcar que a pesar del gran acúmulo de conocimientos conseguido sobre la maquinaria epigenética, sobre todo en lo que llevamos de siglo XXI, quedan, no obstante, muchas lagunas de conocimiento. En esta ruta del dinamismo entre ADN y ambiente ¿qué hace que una señal de un factor ambiental sea represora o por el contrario reclute factores de transcripción? ¿En qué circunstancias y por qué ocurren ambas cosas? ¿qué cuestiones propician y qué circunstancias producen una u otra vertiente y por qué?

Es indudable que estamos en el camino de encontrar las respuestas y también que ello propiciará el hallazgo de terapéuticas, hoy muy necesarias, para enfermedades autoinmunes, cáncer o patologías neurodegenerativas.

Lo que si hemos llegado a establecer y es totalmente aceptado en el mundo científico es que, *diferencias interindividuales en marcas epigenéticas darán como resultado diferencias interindividuales en el fenotipo*, tal como afirma Meaney (29). Y dicha aseveración ha venido a esclarecer, científicamente, el modelo vivo humano de los gemelos homocigóticos. Cualquiera que los haya tenido cerca sabe que tienen el mismo ADN pero, ya desde su nacimiento, su vulnerabilidad a determinadas enfermedades es distinta, y, lo que es más sutil son personalidades

diferentes y de forma aún más clara si su biografía no es la misma. Dicho de otro modo, hoy está aceptado que *el fenotipo es el producto de continuas interacciones entre el genoma y el ambiente* (42).

La biología, en general, ha sido *genocéntrica* en las pasadas nueve décadas, sin embargo, actualmente, parece claro que el destino de un gen no está definido por la secuencia de su ADN, por sí misma, sino también por la manera según la cual un gen es marcado y programado por modificaciones cromáticas, metilación de ADN y por no codificantes ARN(29).

Otra cuestión que es muy importante en biología: ¿se transmiten generacionalmente los cambios epigenéticos?

Aunque actualmente existe bastante controversia al respecto y realmente falta investigación rigurosa sobre este tema, vamos, sin embargo, a tratarlo a continuación.

7. POSIBLE TRANSMISIÓN TRANSGENERACIONAL DE MARCAS EPIGENÉTICAS

Antes de seguir adelante señalaremos la gran importancia biológica que entraña esta pregunta para dos vertientes de investigación actuales.

La primera vertiente nos hace volver al principio de este trabajo.

Situaciones ambientales adversas durante el desarrollo programan de forma anómala, en periodo fetal, el axis HPA -.hipotálamo –hipofisis –adrenal- con la consiguiente mala respuesta al estrés durante toda la vida, y además reduce el peso al nacimiento. Ambas cuestiones son un factor de riesgo de padecer patologías, en periodo adulto, comprendidas en el síndrome metabólico -alteraciones cardiovasculares, diabetes 2, o hipertensión- como expusimos. Desde finales del siglo XX está claro que la mala programación del axis HPA y la reducción del crecimiento se producen por la llegada masiva de glucocorticoides maternos al feto y a la placenta, que finalmente reducen el número de receptores de glucocorticoides GR, pero todo ello, que fue investigado en el siglo XX, dejaba una pregunta pendiente que formulamos al principio: ¿por qué mecanismo los glucocorticoides disminuyen los receptores de glucocorticoides GR en hipocampo y quizá en la placenta?

Y para contestar a ella ha habido en el siglo XXI, como venimos exponiendo, que profundizar en los mecanismos epigenéticos. Y hoy existen resultados que indican que el mecanismo utilizado en dicha anómala programación por los glucocorticoides es un proceso epigenético.

Al principio de este trabajo remarcamos la importancia de la placenta, y de la necesidad de su buen funcionamiento para el crecimiento fetal. Y a partir de 2011 han comenzado a publicarse trabajos que demuestran que la restricción del

crecimiento al nacimiento en humano está asociada con pautas anómalas de metilación de ADN en sus placentas, cuando se las compara con la metilación de placentas de niño con un peso normal al nacimiento. Hay que hacer notar que en alguno de estos trabajos, muy rigurosos, se han utilizado alrededor de 206 placentas humanas (43). Pero, además, también, en otros trabajos se ha encontrado correlación muy alta, en humano, entre la metilación del ADN en el promotor del receptor de glucocorticoides GR en placenta y el bajo peso al nacimiento, habiendo utilizado alrededor de 406 placentas humanas procedentes de niños de bajo peso y de sus controles, niños de peso normal al nacimiento y los cuales no tenían metilada la misma zona en el promotor del gen que expresa GR (44). Es decir, comenzamos a poder con rigor establecer que la llegada masiva de glucocorticoides, por una parte reduce el peso fetal y, por otra, programa mal el axis HPA de forma irreversible, y ambas cosas se realizan por el mismo mecanismo epigenético. Provocando, finalmente, la disminución de receptores GR en placenta o en el hipocampo por metilación del ADN en el promotor del gen que expresa estos receptores de glucocorticoides en placenta y en hipocampo fetal según hemos expuesto en los trabajos de Meaney (28, 29)

Decíamos al principio que la llegada de glucocorticoides maternos al feto programaba mal el axis HPA y ello era un factor de riesgo de enfermedades en periodo adulto. Pero si dicha mala programación se realiza por un mecanismo epigenético y, este se trasmite a lo largo de generaciones, la mala programación del HPA en periodo fetal, se convierte en un factor de riesgo, no solamente en periodo adulto sino un factor de *riesgo en su descendencia y a través de generaciones*. Es decir, es un problema mucho mayor en vertiente sanitaria y para la raza humana. Por ello, a partir de 2010, existe una literatura abundante, aunque no suficiente, intentando establecer si las marcas epigenéticas se transmiten por vía generacional. Ya que ello es ahora de máxima importancia biológica y sanitaria.

La otra vertiente de no menos importancia que la reseñada, contempla una deriva evolutiva.

También al principio se enunció el concepto darwiniano de la allostasis y se afirmó que si la allostasis abarca los mecanismos que los organismos poseen para adaptarse a una situación de emergencia y sobrevivir, en todo ello había una reminiscencia darwiniana. Dijimos que cuando en el siglo XIX Charles Darwin escribió el *Origen de las Especies* y expuso su teoría sobre la *selección natural*, por la cual según él evolucionaban las especies, no se conocía ningún mecanismo, en aquella época, por el que se pudiera realizar dicha *selección natural*. Pero como anunciamos en el siglo XXI comenzamos a conocer algún mecanismo para ello. Pues bien, ese mecanismo parece que son los procesos epigenéticos, pero, como anteriormente dijimos, siempre que consigamos demostrar que las marcas epigenéticas se transmiten a través de las generaciones.

No obstante, y a pesar de que se está investigando intensamente, aún no existen suficiente bagaje de conocimiento para poder afirmarlo, sobre todo, si no hablamos de células germinales

Hay que señalar que esta vertiente de investigación fue movilizada por la publicación de Anway en el 2005 cuyo trabajo está siendo ampliamente citado (45).

Estos autores comienzan por plantear que los efectos transgeneracionales de toxinas ambientales solamente pueden producirse por una alteración cromosómica o epigenética en la línea germinal.

En su trabajo eligen dar vinclozolin (un antiandrógeno, ya que se fija a los receptores de andrógenos) o methoxychlor (un compuesto estrogénico que se fija a los receptores de estrógenos). El vinclozolin es un fungicida usado en la industria del vino y el methoxychlor es un pesticida como el DDT. Eligen para el experimento el periodo en que, en la rata, se produce la diferenciación sexual, que es en los fetos rata de 12 a 15 días de gestación, lo que en humano sería a mitad de su gestación.

En dicha etapa inyectan, por vía intraperitoneal, a madres gestantes de camadas distintas, uno de los dos compuestos. Actuando, en ambos casos, sobre embriones de 8 días de gestación y continuando hasta embriones de 15 días. De los dos compuestos inyectan 200 mg por kg de peso y día.

Hay que recordar que la diferenciación sexual se produce en los machos mamíferos por la diferenciación de los testículos, cuyo acontecimiento más evidente es la diferenciación de las células de Sertoli. Es, además, ese un momento en que existen en el embrión cantidades enormes de receptores de andrógenos (AR) y de estrógenos (ER beta). Hay que recordar, también, que dicha diferenciación sexual, en los mamíferos, se produce en los machos ya que, a pesar de su dotación genética de XY, se diferenciarían como hembras, en vertiente neuroendocrina y de conducta, si en un determinado momento, específico para cada especie, no surgieran los testículos y la secreción enormemente alta de testosterona fetal (46).

Estos autores dejan crecer a las crías hasta periodo adulto y en ambas camadas, las inyectadas con vinclozolin y las inyectadas con methoxychlor, encuentran en los machos una gran infertilidad con disminución del número de los espermatozoides y también su movilidad, además, de alteraciones histológicas en los testículos. Todo ello en un porcentaje del 90% de la población de crías machos analizadas. En periodo adulto cruzan estos machos, más bien el 20% de ellos que parecen normales sus testículos, con hembras normales. Y encuentran hasta la cuarta generación que sus crías machos presentan las mismas anomalías y en igual proporción.

Estudian las pautas de metilación del ADN en células de los testículos de estos animales adultos y las encuentran anórmalmente metiladas con respecto a machos de la misma edad cuya madre no fue tratada en periodo gestante. Y hallan una correlación positiva entre su infertilidad y las pautas de metilación de ADN en células testiculares. Comprobando que todo ello encierra a nivel genético un mecanismo epigenético. Es interesante consignar que las crías hembra de madres tratadas parecen, en principio, no presentar alteraciones, aunque fueron menos estudiadas.

Es un trabajo muy riguroso y que sigue siendo, como hemos dicho, enormemente citado. Estos autores dicen literalmente al final de su trabajo: *la habilidad de un factor ambiental (por ejemplo un disrupto endocrino, como ellos llaman a esas drogas) para reprogramar la línea germinal y para promover un estado patológico tiene implicaciones para la biología evolucionista y para la etiología de enfermedades.* Y así es, evidentemente.

Su trabajo muestra que los procesos epigenéticos en momentos claves del desarrollo, por irrupción de factores ambientales externos y que alteran la aparición o la secuencia normal de acontecimientos, son transmitidos a las nuevas generaciones. Dada la importancia de estas cuestiones se está trabajando intensamente en esta vertiente

A partir del 2010 se están publicando muchos trabajos, sobre todo de transmisión generacional por vía paterna, mostrando que situaciones psicopatológicas sufridas por crías macho en su periodo de desarrollo parecen provocar metilaciones de ADN en determinados genes, algunos de ellos a nivel cerebral (47) y ya en 2007 (48) se encuentran trabajos interesantes con respecto a la transmisión intergeneracional por agentes químicos que son llamados en lenguaje anglosajón *endocrine -disrupting chemicals* (químicos- disruptores- endocrinos) del tipo de los utilizados por Anway(45). Pero en todos estos trabajos la transmisión es por vía paterna y cuando el factor ambiental, psicológico o químico, ha irrumpido en periodos de desarrollo.

Es mucho más difícil encontrar trabajos rigurosos actualmente de transmisión por vía materna; sin embargo, en 2010 hay que citar un trabajo de Matthews (49), por el esquema que incluye de transmisión de un axis HPA anómalo por vía maternal, aunque para aceptar su hipótesis de transmisión por vía materna habrá que esperar a más y más rigurosas y abundantes investigaciones (figura 13) (49).

Es evidente y ampliamente aceptado por el mundo científico que las alteraciones epigenéticas cuando se producen en momentos de desarrollo parecen transmitirse a través de generaciones, aunque en este momento falta profundizar en esta vertiente.

Está totalmente establecido y ampliamente aceptado en el mundo científico que los mecanismos epigenéticos modulan y alteran la expresión genética por supuesto en periodos de desarrollo pero parece que también en células postmitóticas, en tejidos envejecidos se han encontrado enzimas como la histona deacilasa pero aún existe cierta controversia sobre otras enzimas de la maquinaria epigenética.

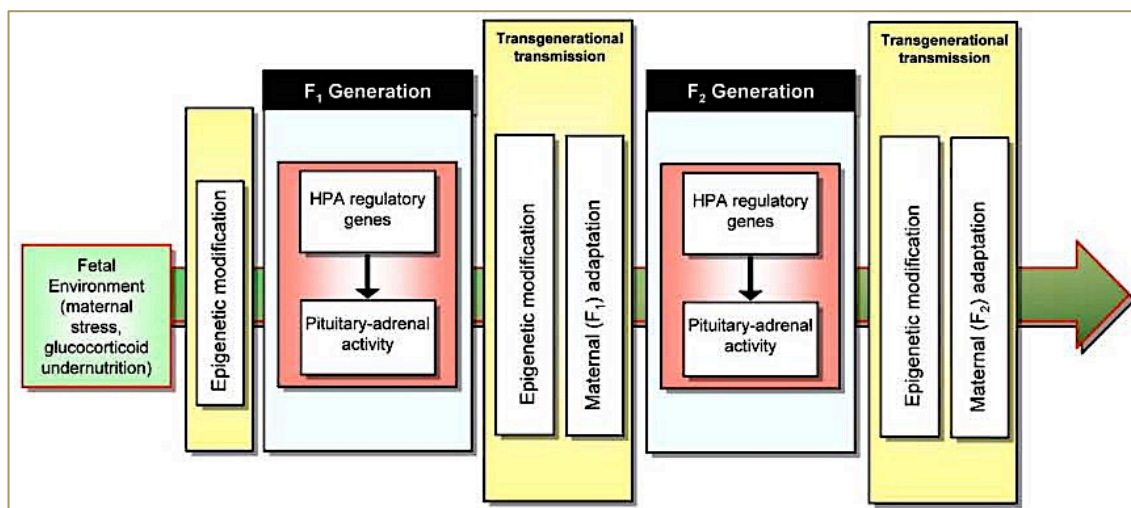


Figura 13.- Posible transgeneracional programación del eje HPA. Se intenta mostrar cómo por vía materna se podría hacer un paso transgeneracional de las modificaciones epigenéticas que provocan la programación anómala del eje HPA. En la parte izquierda se señala que un mal ambiente fetal por estrés materno, por darle glucocorticoides a la madre gestante o por su malnutrición producen cambios epigenéticos, descritos a lo largo de este texto, que conforman mal su eje HPA. Y esas modificaciones epigenéticas aparecerán en las crías de la primera generación en machos y hembras, como se ha expuesto, y su eje se programará de forma anómala, todos estos sucesos están englobados en la figura en el amplio recuadro llamado “Transgeneracional transmisión”. Pero en la segunda generación las crías hembras, cuando vayan a ser madres, lo harán con un eje programado en la primera generación de forma anómala, entonces, ante cualquier situación de emergencia, su eje HPA responderá desmedidamente y de nuevo sus crías sufrirán “trans generacional trasmisión” por el gran número de glucocorticoides que pasaran de la madre al feto y así sucesivamente a través de generaciones. Pero en el momento actual faltan número y rigor, en las pocas publicaciones sobre este tema que hay, para poder sustentar y defender dicha hipótesis por vía materna. Gráfica reformada de cita (49).

Es evidente el gran aporte de conocimiento realizado, prácticamente todo en el siglo XXI, sobre la maquinaria epigenética pero antes de concretar y enunciar conclusiones quiero señalar que en su magnífico libro *Genética del Profesor*. Lacadena (50) afirma que existe una genética anterior al descubrimiento del ADN y otra posterior a él, y en el momento actual parece que estamos asistiendo a un nuevo cambio de paradigma.

También para hacer justicia a la creatividad de la mente humana hemos confeccionado el esquema 5 desde el siglo XVIII al siglo XXI. El médico francés Jean-Baptiste Lamarck nacido en 1744 concibió y habló ya de la evolución de las especies, sin más tecnología que su cerebro y su observación. Decía, simplificando mucho, que las adaptaciones adquiridas, propiciadas por el ambiente con fines de supervivencia, se mantendrían a través de las generaciones y así se produciría la

evolución. Probablemente sus escritos los conocería Charles Darwin (1809). Las teorías de Lamarck han sido muy rebatidas e incomprendidas más aún que las de Darwin. Han tenido que pasar casi dos siglos para que nuevas mentes humanas hayan encontrado los mecanismos epigenéticos con los cuales podrían los organismos evolucionar. Pero también en historia de la ciencia reciente hay que recordar con humildad, que es lo que la Ciencia enseña, que en 1957 Waddington que había sido el primero que definió la epigenesis, lanzó su *The Waddington's epigenic landscape* (El paisaje epigenético de Waddington) (51) cuyo postulado se ha mantenido en la ciencia por muchos años y que niega la posibilidad de reprogramación y transdiferenciación celular. Pero el año 2006, S. Yamanaka publicó su trabajo en el cual con sus cuatro factores de transcripción llamados factores de Yamanaka consigue reprogramar fibroblastos embrionarios y adultos a células madre pluripotentes o células iPS (*induces pluripotent stem cells*), que echa por tierra la teoría de Waddington y establece la reprogramación celular y por lo cual Yamanaka recibió en 2012 el Premio Nobel de Fisiología. Actualmente, podemos decir, que hemos entrado en la posibilidad de transdiferenciación celular.

DESDE EL SIGLO XVIII AL SIGLO XXI

- Jean-Baptiste Lamarck (1744)

- Charles Darwin (1809)

-Waddington 1957 «The Waddington 's epigenetic landscape»

-S. Yamanaka (2006) Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2012

Esquema 5.

8. CONCLUSIONES

1. En el momento actual parece establecido el gran dinamismo que existe en la expresión genética a través de procesos químicos y, la gran aplicabilidad terapéutica, si se consigue revertirlos, que pueden tener estos descubrimientos en el futuro; en cáncer, enfermedades autoinmunes o neuropatologías.
2. Las modificaciones cromáticas, de cuyo conocimiento estamos al comienzo, son, sin duda, una interfase entre las variaciones ambientales y el genoma, en un proceso, por medios químicos, de adaptación dinámica. Todo ello podría abrir, en el futuro, enormes expectativas en vertiente evolucionista.
3. La neuroepigénesis está en sus comienzos pero puede tener gran aplicabilidad terapéutica en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer.

9. REFERENCIAS

1. Pascual-Leone A.M (2013) El concepto de allostasis en la Biomedicina actual *An. Real Acad.Farm.Vol.79 N° 1, pag.69-89.*
2. Selye H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agent. *Nature 138:132.*

3. Korte M., Mc Ewen B.S. et al. (2005). The Darwiniano concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostasis load and the trade -offs in health and disease *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29:2-38.
4. Pascual-Leone A.M. y Goya Suarez L (2008) Síndrome metabólico y desarrollo perinatal: alteraciones corticosuprarrenales In: Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas Monografía XXIII,pag27, Madrid Instituto de España, RANF, Eds. .Pascual-Leone A.M. y Medina J.M.
5. Pascual-Leone A.M. (2010) Acciones cerebrales de los esteroides: estado actual de la respuesta al estrés e implicaciones en la conducta In: Acción de las hormonas a nivel cerebral Monografía XXIX pag. 35 Madrid. Eds. Pascual-Leone A.,M. y Medina J.M.
6. Pascual -Leone A.M. (2006) Desarrollo fetal y neonatal In: Procesos epigenéticos postformación y factores externos pag. 45-89 Curso 23 -28 octubre Coordinado por A.M.Pascual -Leone en Instituto de España Madrid.
7. Welberg L.A., Seckl J.R.(2001) Prenatal stress, glucocorticoids and programing of the brain (Review)(209 ref)*J. Neuroendocrinol.* 13:-113-28.
8. Maccari S., Morley-Fletcher S. (2007) Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavior and neurobiological alterations *Psiconeuroendocrinology* 32 (Suppl.1)S10-S15).
9. Barker D.J. (1999) Fetal origins of cardiovascular disease *Ann. Med.* 31 (Suppl1), 3-6.
10. Pascual-leone A.M. (2008) Desarrollo de mamíferos a la luz de los conocimientos científicos actuales: su interés sanitario . Discurso inaugural leído en la Solemne Sesión Inaugural del curso celebrada el 17 de enero de 2008. Publicación de la RANF Instituto de España.
11. Hales C.N. and Barker D. J.P. (2001) The thrifty phenotype hypothesis *British Medical Bulletin* 60:5-20.
12. Barker C.J.P. Eriksson J.G. et al (2002) Fetal origin of adult disease: strength of effects and biological basis *International Journal of Epidemiology* 31:1235-39.
13. Gluckman P. D. (1995). The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: role of insulin-like growth factors. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 80(4): 1047.
14. Braum T., Chalis J.R. et al (2013) Early-life glucocorticoid exposure: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and long-term disease risk. *Endocrine Reviews*, December 2013, 34(6), 885-916.
15. Clifton VL (2005): Sexually dimorphic effects of maternal asthma during pregnancy on placental glucocorticoids metabolism and fetal growth *Cell Tissue Res.*322: 63-71.
16. Newnham J.P. Jobe AH (2009): Should we be prescribing repeated courses of antenatal corticoids? *Semin fetal Neonatal Med* 14:157-163
17. Pascual-Leone AM.(1988)Hormonas Placentarias. In: Bioquímica Perinatal Aspectos básicos y patológicos. Ed. Emilio Herrera pag 109-131, Fundación Areces Madrid.
18. Pascual-Leone AM. (1998)Nutrición y desarrollo:regulación de los factores de crecimiento IGFs *Anal. Real, Acad,Farm.* 64:347.
19. Rivero F., Goya L, Pascual-Leone AM (1995) Effects of undernutrition and diabetes on serum and liver mRNA expression of IGFs and their binding proteins during rat development *J. of Endocrinology* 145:427.
20. Goya L., Pascual-Leone AM et al (1999) Regulation of IGF-I and II by glucose in primary cultures of fetal rat hepatocytes *J. Biol. Chemistry* 274:2463.
21. Challis J. R., Sloboda D. et al (2001). The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and postnatal health. *Mol.Cell.Endocrinol* 185:135-144.
22. Challis JR, Brooks A. N. (1989). Maturation and activation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in fetal sheep *Endocrine Review* 10:182-204.
23. Cottrell E.C. and Seckl J. R (2009).Prenatal stress, glucocorticoids and programing of adult disease, *Frontiers in behavioral neuroscience* September 2009, vol.3 Article 19, doi:10.3389/neuro.08.019.2009.
24. Esteller M.(2014). Introducción a la epigenética(2014) .Marzo .nº 179 . Revista trimestral de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular SEBBM.
25. Razin A., Shemer R. C.(1995). DNA methylationearly development *.Hum. Mol.Genet.*4: 1751-55.
26. Razin A. (1998). CpG methylation chromatin structure and gene silencing: three way connection. *Embo.Journal* 17:4905-08.
27. Razin A. (1980) DNA methylation and gene function. *Science* 210:604-10.

28. Weaver I. C., Meaney M. J. et al. (2004) Epigenetic Programming by maternal behavior *Nat. Neuroscience* 7:647-854.
29. Szyf M., McGowan P., Meaney M. J. (2008). The Social Environment and the Epigenome. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49:46-60.
30. Meaney M. J., Weaver I. C., et al. (2000). Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: The effects of thyroid hormones and serotonin. *J. Neurosci.* 20: 3926-35.
31. Meaney M. J. et al. (1989). Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology* 50:597-604.
32. Smythe J. W., Meaney M. J. et al. (1994). Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 6-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship in handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Developmental Brain Research* 80:183-89.
33. Meaney M. J., Diorio J. et al. (2000). Postnatal handling increases the expression of cAMP – inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones *J. Neuroscience* 20:3926-35.
34. Seckl JR. (2004) Prenatal glucocorticoids and long-term programming *European J. Endocrinol* 151: 149-62.
35. Bird A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation (review)(61 ref.) *Nature*: 32:209-213.
36. Bird A. P (2001) From genome to epigenome. *Science* 294:2113-2114.
37. Reyes J.C. (2014) La cromatina: la esencia está en el cambio. Marzo. Publicación trimestral nº 179 Sociedad Española de Bioquímica SEBBM.
38. Olins DE., Olins AL (2013) Chromatin history our view from the bridge *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 809-14.
39. Szyf M. (2003). Targeting DNA methylation in cancer *Ageing Res. Review* 2:299-328.
40. Miller C. A., Sweatt J. D. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53:857-69.
41. Levenson J. M., Sweatt J. D. et al. (2006). Evidence that DNA (cytosine -5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus *J. Biol. Chem.* 281: 15763-15773.
42. Meaney MJ and Ferguson-Smith A. (2010) Epigenetic regulation of the neural transcriptome: the meaning of the marks *Commentary epigenetics Nature Neuroscience* vol.13 nº 11 november.
43. Banister C. E., Marsit C. J. et al. (2011). Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas *Epigenetics* 6: 7,920-927.
44. Filiberto A. C., Marsit C. J. et al. (2011). Birthweight is associated with DNA promoter methylation of the glucocorticoid receptor in human placenta *Epigenetics* 6: 5, 566-572.
45. Anway M. D. et al. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility *Science* 308: 1466-1469.
46. Pascual-Leone A.M. (2009) Diferenciación sexual el factor de Jost *An. Real.Acad.Nac.Farm.* Vol.75(4)419-66
47. Franklin T.B. et al. (2010). Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations *Biol. Psychiatry* 68: 408-15.
48. Crews D. et al. (2007). Transgenerational epigenetic imprints on mate preference *PNAS* 104:5942-46 *The Rockefeller University*.
49. Matthews S. G. and Phillips D. I. W. (2010). Minireview: Transgenerational inheritance of the stress response: A new frontier in stress research *Endocrinol.* 151(1)7-13.
50. Lacadena J. R. (1988). Genética, 4ª edición, Imprime A.G.E S.A Madrid.
51. Waddington C. H. (1957). The strategy of the genes a discussion of some aspects of theoretical biology. Londres. Allen and Unwin.
52. Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663 – 76.

Envejecimiento cerebral normal y patológico: *continuum* fisiopatológico o dualidad de procesos involutivos

Adolfo Toledano^{1,2,*}, María-Isabel Álvarez¹, Adolfo Toledano-Díaz³

¹Instituto Cajal, CSIC, Madrid. ²Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

³Departamento de Reproducción, INIA, Madrid

*e-mail: atoledano@csic.cajal.es

Recibido el 7 de abril de 2014

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 3 (2014), pag. 500-539

RESUMEN

Desde hace años existe una controversia sobre si existe una doble vía (dualidad involutiva) de involución senil del cerebro, que podemos denominar, respectivamente, hacia la senilidad fisiológica o “normal” sin signos de demencia, o bien hacia la senilidad “patológica” o Enfermedad de Alzheimer, que se manifiesta por la aparición de una demencia progresiva, o, por el contrario, una sola vía (*continuum*) que conduce desde los primeros signos de involución morfológica o funcional senil hasta la fase final de la demencia EA en todos los individuos. Además, en estos últimos años, se está produciendo una profunda revisión de los conceptos sobre la senilidad patológica / EA de manera que ya no se considera que dicho proceso de envejecimiento sólo existe tras efectuar un diagnóstico de demencia, sino que se inicia en el momento en que se produce una alteración de los circuitos cognitivos cerebrales y/o cambio neuropatológico. Con estos nuevos criterios se supone que la senilidad patológica / EA comprende diversas fases sin demencia (asintomáticas o prodrómicas) y otras con demencia de distinto grado. En esta revisión se analizan las razones que se aducen en defensa de una u otra teoría y las características morfofuncionales de los cerebros seniles normales y los patológicos. La mayoría de los estudios realizados apuntan que existen características diferenciales muy marcadas entre los cerebros seniles normales sin demencia y los patológicos con demencia, pero en otros existen grandes discrepancias entre la presencia o no demencia y la de signos de neuropatológicos. La existencia o no del *continuum* tiene también una muy importante repercusión práctica pues tanto la prevención como la asistencia de las personas mayores dependerán del posible número de individuos afectados: bien solamente los individuos de riesgo o bien toda la población. Existen algunos

terrenos donde la investigación podría hacer avanzar nuestros conocimientos en el envejecimiento cerebral, especialmente en el estudio pormenorizado de los individuos controles sanos de entre 30 y 60 años, en el de los "centenarios" con y sin demencia y en grupos con características diferenciales neuropsicológicas (posibles estadios intermedios de EA según el nuevo "lexicón"). También sería de gran interés estudiar comparativamente el envejecimiento cerebral humano con el de otras especies de mamíferos que no presentaran patología amiloide o tau y con los primates que pueden presentar patología amiloidea. En este último sentido, los animales transgénicos con patología inducida amiloide o/y tau también serían importantes fuentes de información.

Palabras clave: Senilidad cerebral normal; senilidad cerebral patológica; *continuum*; Enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT

Normal and pathological brain aging: a physiopathological continuum or an involutive duality

For years, there is a controversy whether there is a two-way (involutive duality) of senile involution of the brain, which may be called, respectively, pathway to the physiological or "normal" senility, without signs of dementia but with neuronal adaptative responses, and pathway to "pathological" senility or Alzheimer's Disease (AD), which is characterized by the appearance of a progressive dementia, or, conversely, a single way (continuum) leading from the first morphological or functional signs of senile involution until the final stage of AD dementia in all individuals. Moreover, in recent years, a thorough review of the concepts of the pathological senility / EA is producing, so that is not now considered necessary to have dementia to diagnose a pathological aging process because it is considered that the pathological aging / EA is started at the time that a disturbance in cognitive brain circuits and / or neuropathological changes occurs. With these new criteria different clinic-pathological stages are supposed from normal senility to terminal pathological senility / EA, without dementia (prodromal or asymptomatic) and with varying degrees of dementia. In this review the reasons given in defense of one or another theory are analyzed, as well as the morphofunctional features of normal and pathological senile brains. Most studies indicate that there are very marked differential characteristics between normal brains without dementia and senile pathological brains with dementia, but in other, large discrepancies exist between the presence or absence of dementia and the existence or not of neuropathological signs. The existence or not of the continuum also has a very important practical implication for both prevention and care of the elderly, because the possible number of individuals affected: the entire

population or only at-risk individuals in the pathological brain senility pathway. There are some areas where research could improve our knowledge on brain aging, especially in the detailed study of healthy control subjects between 30 and 60, "centenarians" with and without dementia and individuals with neuropsychological characteristics different to AD (possible intermediate stages of AD according to the new "lexicon"). It would also be of great interest a comparative study of human brain aging with that of other mammalian species that showed no amyloid or tau pathology and primates that may have amyloid pathology. Transgenic animals with induced amyloid and /or tau pathology, are also important sources of information on pathological aging.

Keywords: Normal brain senility; pathological brain senility; *continuum*; Alzheimer's Disease.

1. INTRODUCCIÓN

La población mundial crece a un ritmo del 1% anual, con diferencias notables entre los países según su grado de desarrollo y los tramos de edad en que normalmente se dividen las pirámides poblacionales (1). En los países más desarrollados el porcentaje de mayores de 65 años aumenta en mayor grado al no existir recambio poblacional (1, 2). En países como España, las personas mayores de 65 años representan ya el 18% de la población (1). Paralelamente, los recursos y los fondos que los estados dedican a este sector de población son cuantiosos y también tienden a crecer. Todo ello genera una gran preocupación y las políticas socio-sanitarias pasan a ser prioritarias en la gestión de los gobiernos. En este contexto, las patologías relacionadas con la edad se consideran de especial gravedad porque, junto al sufrimiento de los que las padecen y de sus familiares, significan que un número importante de personas precisa mayores atenciones sanitarias y sociales, tanto más cuando se es sujeto de una discapacidad. Los trastornos mentales que cursan con demencia, y especialmente el más paradigmático, la enfermedad de Alzheimer (EA), por las características de la discapacidad que acarrea, de que se trata de una patología que actualmente no tiene prevención ni tratamiento eficaz, y en la que el enfermo requiere la continua presencia de un cuidador, son uno de los mayores problemas del siglo XXI. En el mundo, en 2010, se estimaba que de 758,6 millones de personas mayores de 60 años, existían más de 35,6 millones de personas con demencia (4,7% del total). De ellas, más del 80% eran enfermos de EA (2), que pueden considerarse personas con envejecimiento cerebral "patológico" no dependiente de ninguna enfermedad sistémica o cerebral conocida frente a los ancianos sin trastornos mentales que tienen un envejecimiento cerebral fisiológico/"normal". Y las previsiones para 2.030 y 2.050 calculaban cifras de 65,7 y 115,4 millones de enfermos con demencia (incrementos del 85 y 225% de los valores de 2010), con porcentajes similares de

aumento en EA. Los incrementos a partir de 2025 se han corregido al alza teniendo en cuenta que los “baby boomers”, los niños nacidos en gran número tras el fin de la segunda guerra mundial, cumplen 80 años en esa fecha (3, 4). En 2010, en España existían 0,4 millones de enfermos EA y se preveían 0,7 millones en 2030 y 1,6 millones en 2050, agravándose el problema socio-sanitario y económico español por la drástica disminución de la población más joven que debería actuar tanto como “cuidador” directo del enfermo EA como de “sostén”/“financiador” del sistema socio-sanitario.

Para enfrentarse a los problemas que esta situación plantea, trabajan con especial empeño la medicina preventiva y la planificación socio-sanitaria. Pero para actuar lo más eficazmente en estos dos ámbitos es absolutamente necesario conocer con la mayor exactitud posible los casos que realmente deberán ser atendidos en una época determinada, tanto en los aspectos preventivos como paliativos. Los resultados de los estudios en diversos campos de los últimos años sobre el envejecimiento cerebral humano y las patologías demenciales concurrentes obligan a revisar nuestras previsiones sobre la población de mayores de 60 años que ha aumentado enormemente su límite de supervivencia. No sólo debemos basar las actuaciones en los datos epidemiológicos sobre las enfermedades demenciales, sino también en los nuevos hallazgos sobre la patogenia de la EA y otras demencias y en las posibilidades terapéuticas para combatirlas, tanto preventiva como curativamente. En lo que respecta a la EA, muchos de los nuevos conceptos sobre la enfermedad (5, 6) han puesto de manifiesto la posible existencia de diferentes fases, entidades patológicas y/o subtipos de EA (EA típicas y EA atípicas) que pueden imbricarse de distintas formas, bien como fases consecutivas de un proceso continuado de mayor entidad que lleva a la EA terminal, o bien como formas involutivas o patologías alternativas en la degeneración senil del cerebro (7-9). Así mismo, la diversidad y complejidad de las alteraciones neuropatológicas y neuroquímicas que se van describiendo nos proporcionan un mosaico de posibilidades de nuevos diagnósticos de entidades todavía no bien definidas pero que expresan la posible existencia de diversos cursos patogénicos, o “cascadas” patogénicas, que se pueden imbricar en algunos puntos de la involución, y que sólo tienen en común el deterioro final total de los circuitos cognoscitivos cerebrales que subyace en la demencia terminal (10-12).

En la presente revisión se va a tratar una de las cuestiones de mayor interés en las demencias tipo EA: ¿existe un envejecimiento cerebral normal sin demencia y otro patológico con demencia tipo EA?, o por lo contrario, ¿existe sólo un envejecimiento progresivo donde de manera continuada se pasa por fases seniles sin demencia a otras con alteraciones cognoscitivas leves y que finaliza en lo que ahora consideramos la EA terminal?. Aceptar uno u otro postulado supone un gran cambio de estrategia tanto en la política sanitaria como en medicina preventiva. En

el caso de España, si consideramos cierta la dualidad del curso involutivo, sin demencia o con demencia, habría que incluir en los cálculos asistenciales “solamente” el porcentaje de población susceptible de padecer EA (1,6 millones de personas en 2050), pero si se considera que existe un *continuum*, se deberían establecer medidas preventivas y sistemas asistenciales para más de 13,5 millones de españoles que se verán afectados hacia mitad del siglo XXI (1,13). Por otro lado, si los nuevos postulados sobre la diversidad de procesos patogénicos incluidos en el universo Alzheimer (2, 5, 6, 13) se confirman, el número de afectados debería revisarse al alza aunque habría que considerar como elemento corrector la posible eficacia de nuevas medidas preventivas específicas que actúen sobre las nuevas dianas terapéuticas que va ofreciendo la investigación. Además, habría que intensificar las medidas preventivas en individuos asintomáticos en edad adulta (40-50 años) para combatir las alteraciones patológicas más precoces que pudieran aparecer en el inicio del envejecimiento. Actualmente es un reto el diseño de métodos y herramientas para definir la posible población en riesgo para ser especialmente tratada contra la neurodegeneración.

La polémica sentencia “todos padeceremos Alzheimer con tal de que vivamos el suficiente número de años” ha trascendido ya fuera de los ámbitos científicos y tiene unas implicaciones socio-sanitarias y económicas importantísimas que sólo la investigación puede fijar en los justos límites al definir y diagnosticar con precisión los individuos en riesgo de padecer EA. En esta revisión se analizará tanto el concepto de *continuum* entre el envejecimiento cerebral normal y patológico dentro de las nuevas teorías sobre la etiopatogenia y clínica de la EA y los argumentos científicos que sustentan o niegan su existencia, como las líneas de investigación actuales más importantes para esclarecer este importante problema.

2. INVOLUCIÓN CEREBRAL SENIL NORMAL Y PATOLÓGICA. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El ciclo vital nacimiento-desarrollo-envejecimiento-muerte se cumple en todos los seres vivos. Todos los órganos y sistemas de los seres del reino animal también cumplen este ciclo desde la formación de su primordio hasta el fallecimiento del ser que los alberga, aunque las características de este proceso de desarrollo e involución sean muy diferentes ya que son específicas de cada uno de ellos.

El Sistema Nervioso Central (SNC) presenta un desarrollo de diseño muy especial (14, 15). En el período embrionario de cada especie, se crea una ingente cantidad de neuronas pero sólo sobreviven las que emigran hacia lugares predeterminados, los “núcleos grises” del SNC, y establecen conexiones correctas con otras neuronas del propio núcleo al que pertenecen o de otros núcleos más o

menos alejados, que también están predeterminados para cada especie. Se crea así la citoarquitectura básica del SNC, fundamento de los circuitos neuronales, que se presenta al nacimiento del ser. En la época postnatal, salvo contadas excepciones en que permanecen áreas de neurogénesis (p.e., en mamíferos, el cerebelo –capa de Obersteiner, 16- y los centros germinales del hipocampo y de la zona paraventricular -17) el desarrollo se centra en el establecimiento y refuerzo de nuevas conexiones neuronales que funcionarán de manera dinámica para cumplir todas las funciones encomendadas al SNC, desde las sencillas respuestas monosinápticas que son la base de algunos movimientos reflejos, hasta las muy complejas respuestas multisinápticas donde intervienen millones de neuronas para cumplir las funciones cognitivas superiores (los diversos tipos de memoria, el juicio, etc.). Además, se ha demostrado que las sinapsis son “plásticas” (18-21), es decir cambian morfológicamente en número, forma y tamaño, así como funcionalmente, aumentando o disminuyendo los componentes macromoleculares específicos para su función y regulando la producción de neurotransmisores, neurorreguladores y segundos mensajeros intracelulares. Esta plasticidad sináptica no es más que una manifestación de la gran capacidad de adaptación que tiene las neuronas (en realidad, son las células que poseen la mayor capacidad de adaptación morfofuncional de todo el organismo) para que sus respuestas sean siempre óptimas y cumplan con los objetivos que cada parte del SNC tiene encomendados (21). Esta adaptación ocurre a lo largo de toda la vida incluso en la fase senil: el envejecimiento cerebral debe entenderse como un proceso involutivo –adaptativo (22) donde no existe reemplazamiento de neuronas, por ser células postmitóticas incapaces de dividirse, pero sí de funciones de algunas neuronas para paliar en parte las pérdidas funcionales debidas a las neuronas desaparecidas o dañadas. Neuronas sobrevivientes que funcionaban en paralelo a neuronas perdidas dentro de diversos circuitos cognitivos, pueden suplantar la función de estas últimas por lo que durante mucho tiempo no se alterará la función cognoscitiva relacionada con el circuito afectado y tienen que ser muchas las neuronas deterioradas o desaparecidas para que la función cognoscitiva de muestras de deterioro. Se ha comprobado de manera experimental como aumentan las sinapsis de muchas regiones del SNC de diversos animales seniles con entrenamiento o bien con su permanencia en “ambientes enriquecidos” (jaulas con juguetes o laberintos) (22, 23). También pensemos que nuestra especie es capaz de leer, entender y aprender incluso al borde del fin de nuestra existencia, pues existen fenómenos adaptativos en las neuronas supervivientes, que incluyen neosinaptogénesis (24), para mantener muchas de las funciones cognitivas. Es decir, a partir de cierta edad en que se alcanza la madurez (entre los 30 y los 50 años), muchos de los circuitos neuronales establecidos y perfeccionados por las conexiones sinápticas desde el nacimiento se van a modificar, pero esto ocurre tanto por el proceso involutivo senil, donde mueren o disfuncionan muchas

neuronas anulando o dañando los circuitos, como por la puesta en marcha de mecanismos adaptativos para contrarrestar estas pérdidas morfofuncionales (Figura 1).

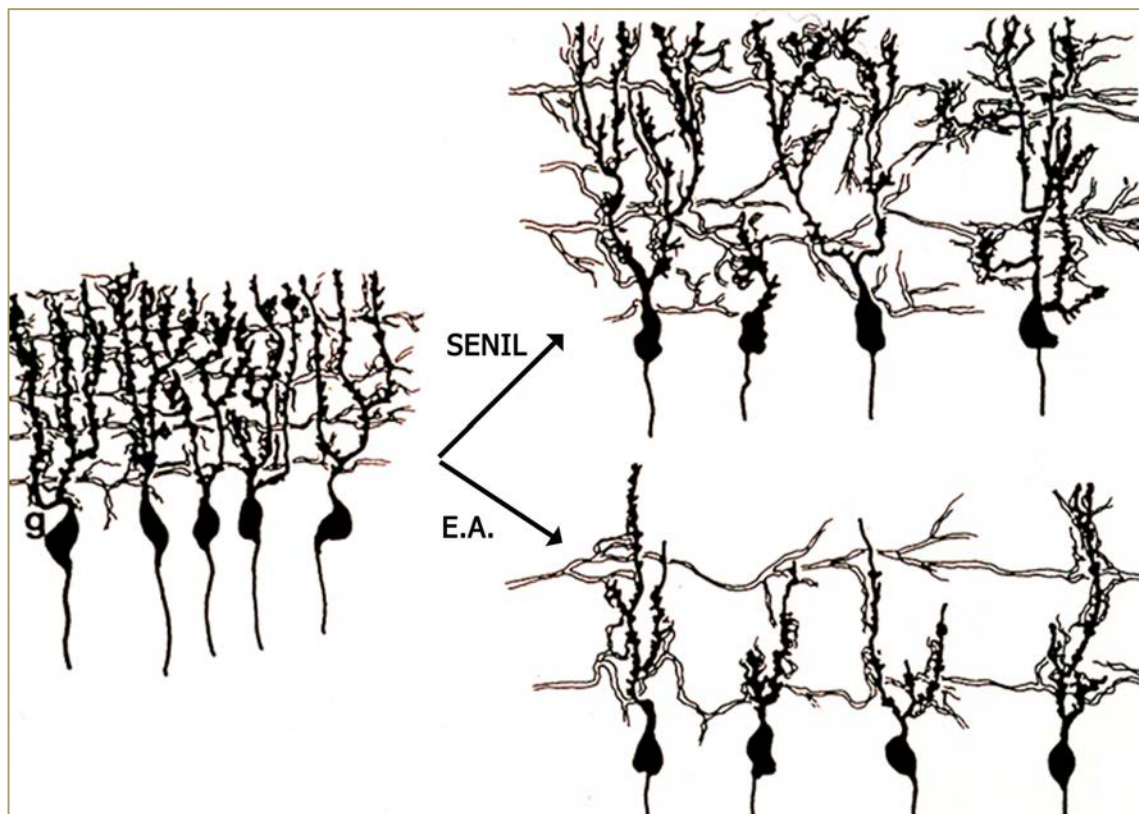


Figura 1.- Esquema que representa las diferencias fundamentales entre el proceso de “senilidad normal” (senil) y el de “senilidad patológica” en las células piramidales del hipocampo. En ambos casos existe pérdida neuronal y de fibras aferentes, pero en la senilidad normal o fisiológica, los procesos adaptativos originan crecimiento dendrítico neuronal y neosinaptogénesis en las neuronas remanentes y en las fibras aferentes a las mismas. Esto no sucede en la enfermedad de Alzheimer o senilidad patológica.

En un cerebro senil “normal” encontraremos un menor número de neuronas en diversas regiones del SNC (aunque no tan grande como se señalaba hace unos años), una más importante pérdida de sinapsis sobre muchas neuronas y una disminución de moléculas importantes para la conexión sináptica y la neurotransmisión. Se pueden apreciar neuronas atroficas y distróficas, la base del proceso de involución senil, pero también hipertróficas y/o hiperactivas debidas a la adaptación neuronal, con aumento de sinapsis recibidas y/o sinapsis producidas por sus axones o bien que posean una mayor capacidad de producción de neurotransmisores, mensajeros extracelulares, receptores o moléculas específicas de la función sináptica. En general, no parecen existir alteraciones estructurales muy importantes de neuronas ni tampoco de las células gliales acompañantes (astrogliales y microgliales) ni de los vasos sanguíneos. Los individuos cuyos cerebros tienen estas características, no presentaban alteraciones muy importantes o globales de las funciones cognitivas y comportamentales; es

decir, no padecían demencia cuya característica, según la OMS (25), es “la pérdida de múltiples –todas- funciones cognoscitivas como son la memoria-s-, el pensamiento abstracto, el juicio, ...”). Sólo en algunos casos se apreciaban ligeros deterioros en memoria, lenguaje, cálculo, etc.

Por el contrario, existen individuos seniles que manifiestan un grado variable de demencia (de leve a grave), con alteraciones importantes de todas las funciones cognoscitivas, aunque no todos los deterioros cognoscitivos se hayan iniciado simultáneamente ni su progresión curse en paralelo. El estudio del cerebro de estos individuos muestra que, además de las alteraciones antes mencionadas del cerebro senil “normal”, aparecen lesiones o cambios aberrantes en las neuronas y en las células gliales. No sólo se trata de una “exageración” del deterioro que consideramos normal sino que nos encontramos en presencia de nuevos elementos que consideramos patológicos (neuropatológicos) dentro y fuera de las células (“ovillos neurofibrilares” y “placas amiloides”, en especial). Hablamos entonces que ha existido una neurodegeneración o involución neurodegenerativa que se manifiesta clínicamente en vida con demencia. Se trata de un “envejecimiento senil patológico” por contraposición al anteriormente reseñado, el “envejecimiento senil normal o fisiológico”.

Alois Alzheimer, en 1906-7 (26), fue el primero en describir en el cerebro de una mujer que había padecido demencia, una serie de alteraciones neuropatológicas (luego denominados ovillos y placas) que aunque inicialmente consideró como signos de senilidad precoz, luego describió como signos de una enfermedad nueva o senilidad patológica frente la senilidad “normal de la mayoría de los individuos”. Esto fue así confirmado por Kraepelin en 1910 (27) y posteriormente avalado por la investigación científica básica y clínica. A lo largo de los años han ido evolucionando muchos de los conceptos sobre la Enfermedad de Alzheimer, pero esta idea de que se trata de un envejecimiento cerebral patológico, permanece inalterable.

De la imposibilidad de estudiar en profundidad y con los mismos métodos el cerebro de los humanos vivos y el de los ya fallecidos, tanto de individuos con senilidad normal como patológica (individuos que habían padecido demencia), surge el concepto clásico dual de la enfermedad, clínico en vida y neuropatológico post-mortem. Estos conceptos “clásicos” (de la época de Alzheimer) se mantienen durante muchos años y son la base de las descripciones “modernas” de la enfermedad tales como se recogen en la CIE-10 de la OMS (1960) (25) y en el manual de Diagnóstico Estadístico (DMS-III, DMS-IV y DMS-V) de la Academia de Patología Americana (1960, 1970 y 2014) (28, 29), donde se marcan pautas para el diagnóstico. Diversos estudios de consenso establecen protocolos de diagnóstico, tanto pruebas neuropsicológicas desarrolladas exprofeso para caracterizar con mayor precisión la demencia en la clínica, como estudios anatomopatológicos

pormenorizados para tipificar y cuantificar las lesiones de los cerebros post-mortem (30, 31). El diagnóstico en vivo se lleva a cabo cuando existe un cuadro demencial de comienzo insidioso y deterioro lento con ausencia de datos clínicos sugerentes de enfermedad cerebral o sistémica que den razón de la demencia (Cuadro I) (25). Es decir, se realiza un diagnóstico de presunción por exclusión de otra posible patología, neurodegenerativa o no. La confirmación post-mortem del diagnóstico, también ante la ausencia de signos neuropatológicos patognomónicos, se hace de manera estadística, cuando los tipos y la abundancia de lesiones según un estudio estandarizado nos indica, con un alto índice de probabilidad, que existe ésta y no otra enfermedad (30, 31).

CUADRO I

GLOSARIO DE DEFINICIONES SOBRE SITUACIONES Y PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS CEREBRALES Y COGNOSCITIVOS EN LA SENILIDAD Y PAUTAS DIAGNÓSTICAS GENERALES.

SENILIDAD FISIOLÓGICA: Proceso en el que se presentan alteraciones leves en algunas áreas cognitivas (memorias, cálculo, juicio, etc., sin llegar a presentar un cuadro de demencia), comportamentales, sensitivas y motoras que no repercuten de manera importante en la vida del sujeto. Existen alteraciones morfofuncionales involutivas pero no neuropatología en sentido clásico.

SENILIDAD PATOLÓGICA: Proceso en el que se presentan de manera progresiva alteraciones importantes de casi todas las áreas cognitivas, llegando a presentar un cuadro de demencia, con alteraciones graves comportamentales, sensitivas y motoras que repercuten de manera trascendente en la vida del sujeto, haciéndole totalmente dependiente. Existen alteraciones neuropatológicas en sentido clásico. Se asimila a Enfermedad de Alzheimer por la mayoría de autores.

DEMENCIA (CIE-10) (25):

“Síndrome debido a una enfermedad del cerebro, generalmente de naturaleza crónica y progresiva, en la que hay déficits de múltiples funciones corticales superiores, entre ellas la memoria, el pensamiento, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio”

Interfiere en la realización de las actividades de la vida diaria del individuo hasta llegar a hacerlo totalmente dependiente

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (SENILIDAD PATOLÓGICA).

DEFINICIÓN CLÁSICA DE LA EA Y SU DIAGNÓSTICO (CIE-10) (25):

-(Definición basada en estudios post-mortem del cerebro) “Enfermedad degenerativa cerebral primaria, de etiología desconocida que presenta rasgos neuropatológicos y neuroquímicos característicos”

- (Definición diagnóstica *in vivo*). Proceso caracterizado por:

* Cuadro demencial

* Comienzo insidioso y deterioro lento

* Ausencia de datos clínicos sugerentes de enfermedad cerebral o sistémica

* Ausencia de inicio apopléjico, súbito o con signos neuropatológicos focales

Repercute de manera importante en la vida del sujeto, interfiriendo en su vida profesional y social y al no poder llevar a cabo las actividades de la vida diaria le hacen dependiente

(DMS III-V tiene criterios diagnósticos similares aunque les conceda diferente valoración) (28, 29)

NUEVAS DEFINICIONES DEL COMPLEJO EA Y SU DIAGNÓSTICO (Dubois y cols, 2007;2010) (5, 6).

Enfermedad de Alzheimer

Entidad clínico biológica que comprende varias fases sin y con síntomas de demencia hasta llegar a la situación que se corresponde con la EA clásica. Para su diagnóstico se requiere cambios cognoscitivos (memoria) y presencia de “marcadores” de EA (betamiloide, tau y fosfo-tau en LCR; retención de trazadores de amiloide en PET cerebral; atrofia temporal en RM cerebral; alteraciones metabólicas como captación de ¹⁸Fluorodeoxiglucosa en PET; etc.). Pueden existir formas fenotípicamente típicas y atípicas de EA. Comprende la EA prodómica y la demencia EA.

EA prodómica (o estadio de “predemencia EA”)

Fase temprana de la demencia EA que presenta: 1) síntomas de alteración cognoscitiva (especialmente pérdida de memoria de origen hipocámpico), pero sin entidad suficiente para diagnosticar demencia y sin interferir en la realización de actividades de la vida diaria y 2) alteraciones de los biomarcadores EA.

Fase preclínica de la EA

Largo período asintomático de la EA, teóricamente desde que se produce la primera lesión cerebral tipo Alzheimer en un individuo normal hasta que se presentan síntomas de alteración cognoscitiva. Comprende dos estadios:

“Estadio Asintomático de la EA” o “Estadio de alto riesgo para padecer EA”. Se podría identificar demostrando amiloidosis cerebral (p.e., mediante PET con el complejo Pittsburg) o alteraciones “EA” en LCR.

“EA Presintomática”. Período previo a la EA sintomática con posibles signos de cambio. Sólo podría diagnosticarse con certeza en EAs familiares con mutaciones dominantes.

Demencia EA

Fase de la EA en la que los trastornos cognoscitivos en el área de la memoria y otras áreas son tan graves que interfieren con la vida social y laboral y la realización de las actividades de la vida diaria (existe un diagnóstico claro de demencia).

EA típica

El fenotipo más común de EA, caracterizado por pérdida progresiva de la memoria episódica, que es dominante, y a la que se asocian progresivamente pérdidas en otras áreas (ejecutivas, del lenguaje, visuales, etc).

EAs atípicas

Fenotipos clínicos poco corrientes, de un curso clínico anómalo comparado con la EA típica. Son entidades descritas en los últimos años, algunas mal definidas. Se pueden señalar: afasia primaria

progresiva, afasia logopéfica, EA frontal, atrofia cortical posterior. El diagnóstico de EA atípica precisa de la demostración de alteraciones en biomarcadores EA.

EA mixta

Concurrencia de EA típica con evidencias de neuroimagen o bioquímicas de otros procesos comórbidos como Enfermedad Cerebrovascular o Enfermedad de Cuerpos de Lewy.

Patología Alzheimer.

Individuos sin demencia con alteraciones neuropatológicas EA (depósitos de amiloide y tau).

Alteración (o deterioro) cognoscitivo leve (MCI, "mild cognitive impairment").

Alteraciones cognoscitivas leves, que no interfieren en la vida diaria, sin causa aparente (se diagnostica también por exclusión). No presenta características clínicas para el diagnóstico de EA ni tiene alteraciones de los marcadores EA. Puede llegar a presentar EA en un plazo de 3-5 años.

En los últimos años, los resultados de la investigación clínica, neurobioquímica celular y molecular, y neuropatológica, han venido a revolucionar los conceptos sobre la EA de tal manera que se considera la enfermedad como un proceso neurodegenerativo que se inicia mucho antes de que se pueda diagnosticar la demencia en el aspecto clínico, justo cuando se inician las lesiones de los circuitos neuronales (la denominada EA prodrómica) (Cuadro I) (5, 6). El problema reside en que tampoco es todavía posible detectar los cambios morfofuncionales cerebrales con la tecnología actual. Además, se considera que existen unas fases en las que sin existir toda vía la demencia, ya se pueden detectar alteraciones cognoscitivas previas a la demencia, especialmente el deterioro cognitivo leve (5-7).

También, como resultado de estas nuevas investigaciones de los últimos diez años, se han venido descubriendo nuevas entidades de envejecimiento cerebral que, aunque serían minoritarias frente a las dos principales, tienen un gran interés por su posible implicación en ellas. Por un lado parecen existir individuos que se sitúan en ámbitos clínicos entre la demencia y la inexistencia de demencia durante muchos años y los escasos estudios anatomopatológicos que se han realizado con sus cerebros *post-mortem* han mostrado diversidad en el grado de anomalías EA, sin poderse afirmar si eran situaciones patológicas que podrían situarse en la fase prodrómica de la EA, o bien entidades "nuevas" distintas a la involución fisiológica normal y a la EA (32). Por otro lado, se han encontrado cerebros de dementes "clínicamente EA" con alteraciones neuropatológicas que no se corresponden con la patología típica de la EA (EA atípica) (Figura 2). Existen casos sin la típica presencia y distribución de placas y de ovillos neurofibrilares o con la presencia de otro tipo de alteraciones muy marcadas (33, 34). En este último

caso, en los últimos años se ha impuesto la tendencia a segregar estas entidades en nuevas en enfermedades seniles que cursan con demencia que se situarían entre la enfermedad de Alzheimer (típica y atípicas) y otras neurodegeneraciones seniles no Alzheimer como la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (priónica) o el Parkinson-demencia. La demencia frontotemporal, la demencia de cuerpos de Lewy y la atrofia hipocámpica son ejemplos de ello (33-36).

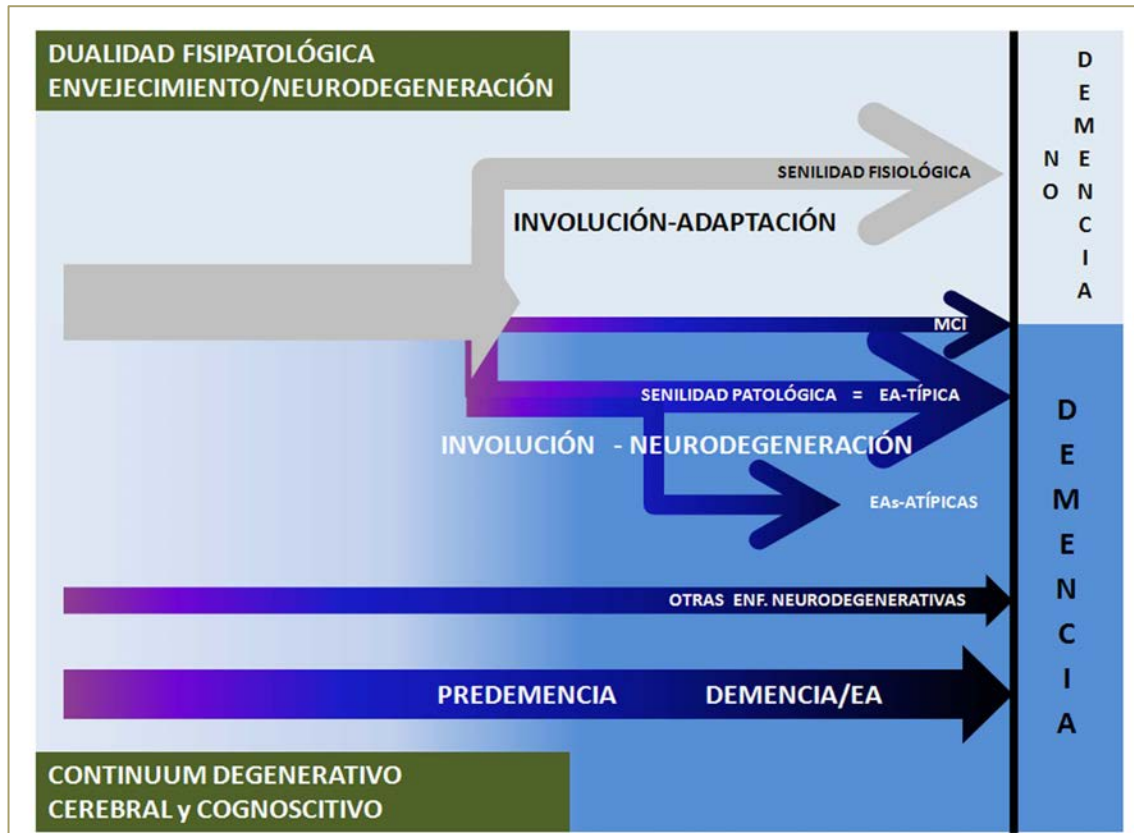


Figura 2. Senilidad fisiológica y senilidad patológica del cerebro. Existen dos distintas maneras de considerar el desarrollo de estos dos procesos de envejecimiento: 1) Por una parte se puede pensar que existe una involución senil que no conduce a la demencia y donde existen, además, signos de adaptación neuronal, glial y vascular que compensan muchos de los déficits morfofuncionales que se producen con la edad; mientras que por otra parte existe una involución que conduce a la demencia y donde predomina la neurodegeneración, lo que denominamos Enfermedad de Alzheimer típica (EA). Al lado de este proceso degenerativo se sitúan otros procesos más o menos relacionadas (EAs atípicas), que también cursan con demencias graves, y otros procesos con alteraciones cognitivas leves pero que nunca llegarán a recibir el diagnóstico de demencia (MCI; alteraciones cognitivas leves). 2) Por el contrario, se puede considerar que todos los individuos sufren un proceso de degeneración cerebral continuado (“continuum”) en el que se transita desde un estadio involutivo senil benigno, sin demencia, hasta la demencia tipo EA más grave pasando por etapas de predemencia con alteraciones morfofuncionales cada vez más graves.

3. ¿EXISTE UN CONTINUUM ENTRE LA INVOLUCIÓN SENIL NORMAL O FISIOLÓGICA Y LA INVOLUCIÓN SENIL PATOLÓGICA TIPO ALZHEIMER?

En la introducción se apuntaba la gran importancia práctica de conocer si existe una continuidad entre la senilidad normal y la patológica en base a que la

demencia típica de la segunda plantea graves problemas sanitarios y sociales. Pero también, teórica y prácticamente, sería de enorme importancia para entender la patogenia y desarrollar terapéuticas para las diferentes involuciones seniles del cerebro. Conocer los mecanismos que condicionan un paso tan grande de la normalidad a la anormalidad senil en caso de que existiese, sería de una gran ayuda para atender a los humanos en su proceso de envejecimiento. Una de las cuestiones más polémicas en este tema es la existencia o no de síntomas o signos “patognomónicos” de EA, es decir que sean indubitadamente indicativos de que un enfermo padezca Alzheimer (o había padecido, en el caso de estudios post-mortem de los cerebros) porque no aparecen en el caso de los ancianos “normales”.

Se ha dado el nombre de *continuum* al teórico desarrollo evolutivo (involutivo) que lleva desde una “normalidad” morfofuncional del cerebro a una “anormalidad” (“o situación patológica”) del mismo (37-40) (Figura 2). Es decir, el *continuum* fisiopatológico equivale en el plano clínico al avance evolutivo del deterioro cognoscitivo que conduce desde la normalidad a la demencia (Figura 2). Por supuesto, los inicios de este *continuum* y las posibles etapas (fases o gravedad de la demencia) por las que discurre el avance del deterioro son tan imprecisos como los términos de “normalidad”, “anormalidad”, “deterioro o alteración leve, moderado, grave, severo”, etc., que se emplean en lenguaje médico y quedan en la mayoría de los casos a criterio del juicio clínico-diagnóstico del profesional a cargo del enfermo. En el mundo anglosajón, bien representado por el DMS III/IV/V, se intenta llegar a diagnósticos más objetivos a través del análisis estadístico de los resultados de las pruebas, especialmente las neuropsicológicas (cognoscitivo-comportamentales), que nos señalan los “puntos de corte” para separar los individuos “normales de los anormales” o los situados en una fase u otra más avanzada de la demencia (Figura 3). Estos puntos de corte se definen por consenso y, en realidad, no establecen con exactitud un diagnóstico sino que indican una probabilidad del mismo que el futuro seguimiento del enfermo, o su estudio post-mortem, se encargará de confirmar.

Lo que sí avala el estudio clínico del deterioro cognoscitivo de las poblaciones, con muestras suficientemente grandes y representativas, es que, con la aplicación de cualquier prueba neuropsicológica mensurable, la representación gráfica corresponderá a una curva de progresión o regresión continuada, lo que parece confirmar el *continuum* en el deterioro cognoscitivo (Figura 3).

La confirmación morfofuncional (neuropatológica, histoquímica, bioquímica celular y molecular, genética) de la existencia del *continuum* es un tema de intenso debate aunque poco estudiado en sí mismo. Aunque algunos aspectos se tratarán más adelante conviene ya señalar las grandes discrepancias de opinión al respecto basados tanto en los resultados obtenidos con distintas técnicas como en la interpretación de resultados empleando las mismas técnicas, además de la

absoluta imprecisión morfofuncional de definir cualquier fase o estadio que teóricamente se presupone que existe desde la “normalidad” absoluta hasta la patología de la EA terminal.

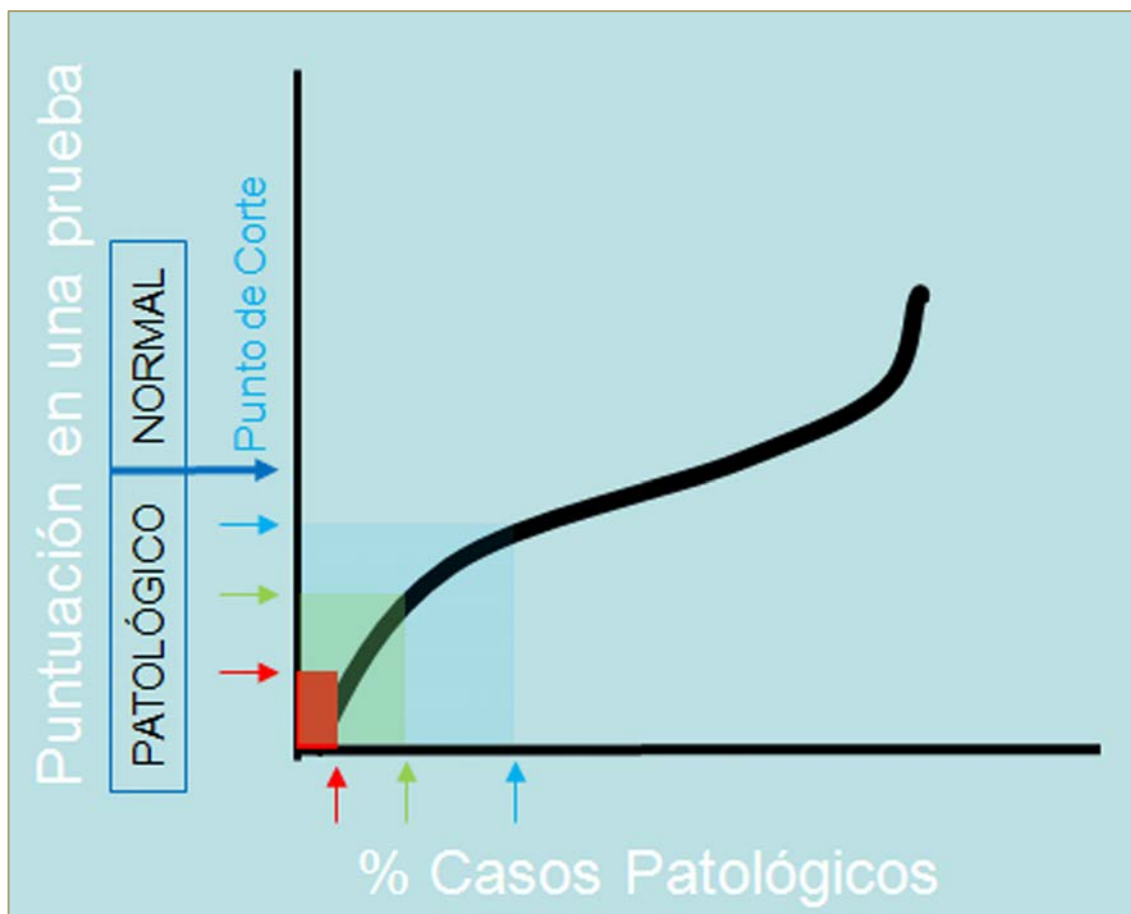


Figura 3.- Los atributos de “normal” y “anormal/patológico” que se asignan a los individuos o a los cerebros post-mortem que se estudian varían según los criterios que se apliquen. El “punto de corte” entre los dos posibles atributos normal/patológico que se puede aplicar a una población en un estudio determinará el porcentaje de casos con uno u otro diagnóstico. En el esquema se ejemplifica esto en una gráfica donde se representa la puntuación de una población en una prueba neuropsicológica teórica donde se pretende determinar el grado de demencia (normal o patológico) en base al número de aciertos en las pruebas que se le realizan. Dependiendo de que el “punto de corte” (puntuación, que se ha acordado por consenso, para diferenciar los individuos normales de los patológicos) sea más o menos exigente, variará el porcentaje de casos diagnosticados como patológicos.

Tomemos como ejemplo los dos principales tipos de lesiones “características” de EA conocidas desde la época de Alzheimer, los ovillos neurofibrilares (acumulaciones intraneuronales de proteína Tau, especialmente altamente fosforilada) y los depósitos amiloideos extracelulares de diferente morfología y composición. En primer lugar, al no ser estas lesiones “específicas” de la EA (ya se dijo que no son patognomónicas) el diagnóstico EA no puede establecerse por la sencilla demostración de su existencia por cualquier método, sino por la densidad de estas lesiones en regiones preestablecidas del cerebro. En segundo lugar, se ha demostrado que en muchos cerebros “normales” (los

“controles” en los estudios sobre la EA), sin sintomatología de demencia, existían muchas alteraciones neuropatológicas señalados como características de EA y por tanto se ha recurrido a fijar criterios diagnósticos basados en el “número” y no en el “tipo de lesiones. Por ello ha sido necesario que se definieran protocolos de diagnóstico, en reuniones de consenso de expertos, para “asegurar” la mayor probabilidad de acierto diagnóstico. En estos protocolos se acuerda el tipo de técnica a utilizar en el diagnóstico (impregnaciones metálicas tipo Bielschowsky, plata-metenamina o Gallyas; reacciones inmunohistoquímicas contra proteína tau/tau-fosforilada y beta-amiloide; reacciones especiales con colorantes como tioflavina-S o Rojo Congo), el tipo de lesión a considerar o cuantificar (especialmente los distintos tipos de “neuritas distróficas” - prolongaciones axónicas o dendríticas neuronales anómalas - con depósitos alterados de proteína tau, así como las diferentes “placas” amiloideas con o sin “core” denso, con corona o no de neuritas distróficas y los acúmulos de amiloide difuso. Figura 4), el número de estas lesiones presentes en regiones seleccionadas del cerebro, y las regiones que deben seleccionarse para el estudio (corteza prefrontal, parietal y temporal; hipocampo; corteza cingulada; etc.) (30, 31, 41). A mayor abundamiento, los protocolos diagnósticos incluyen también como factor importante de corrección a la edad, lo que supone una aceptación de que con el avance de la edad aparecen lesiones patológicas aunque no sean indicativos de demencia o EA. Pues bien, a pesar de todos los avances de la investigación, todavía no se ha definido con exactitud cuáles son las cascadas de acontecimientos neuropatológicos en el transcurso del deterioro cognoscitivo clínicamente detectable ni que acontecimientos podrían marcar una fase determinada de este deterioro que se corresponda con la clínica (10-12, 42, 43). Es decir, la progresión del deterioro cognoscitivo a través de un *continuum* no ha podido ser confirmada o negada por los estudios neuropatológicos ya que no existe una clara y total correlación clínico-patológica del avance de la enfermedad. Los más prometedores estudios llevados a cabo por Braak y Braak (44) mostraron que existía una secuencia congruente de progresión neuropatológica de la EA con las características del deterioro cognoscitivo: la aparición de neuronas con ovillos neurofibrilares (Tau/Tau-fosforilado inmunopositivos) en el cerebro seguía una secuencia definida de seis fases de progresión espacial (grados I a VI de Braak y Braak) (Figura 5) conforme avanzaba el grado de demencia, aunque no se pudiera predecir in vivo el grado Braak y Braak por estudios neuropsicológicos. Por el contrario, a pesar de que la teoría amiloidea de la EA ha sido la que goza y ha gozado de mayores defensores y seguidores, nunca se ha podido demostrar una correlación clínico-patológica entre el grado de demencia y la existencia de tipo y/o número o localización de lesiones amiloideas (45, 46). Así mismo, cada vez está mejor documentado como cerebros de individuos “control”, “sanos” o “no dementes”, presentan características “anormales” en el estudio de muchos parámetros morfofuncionales (47, 48).

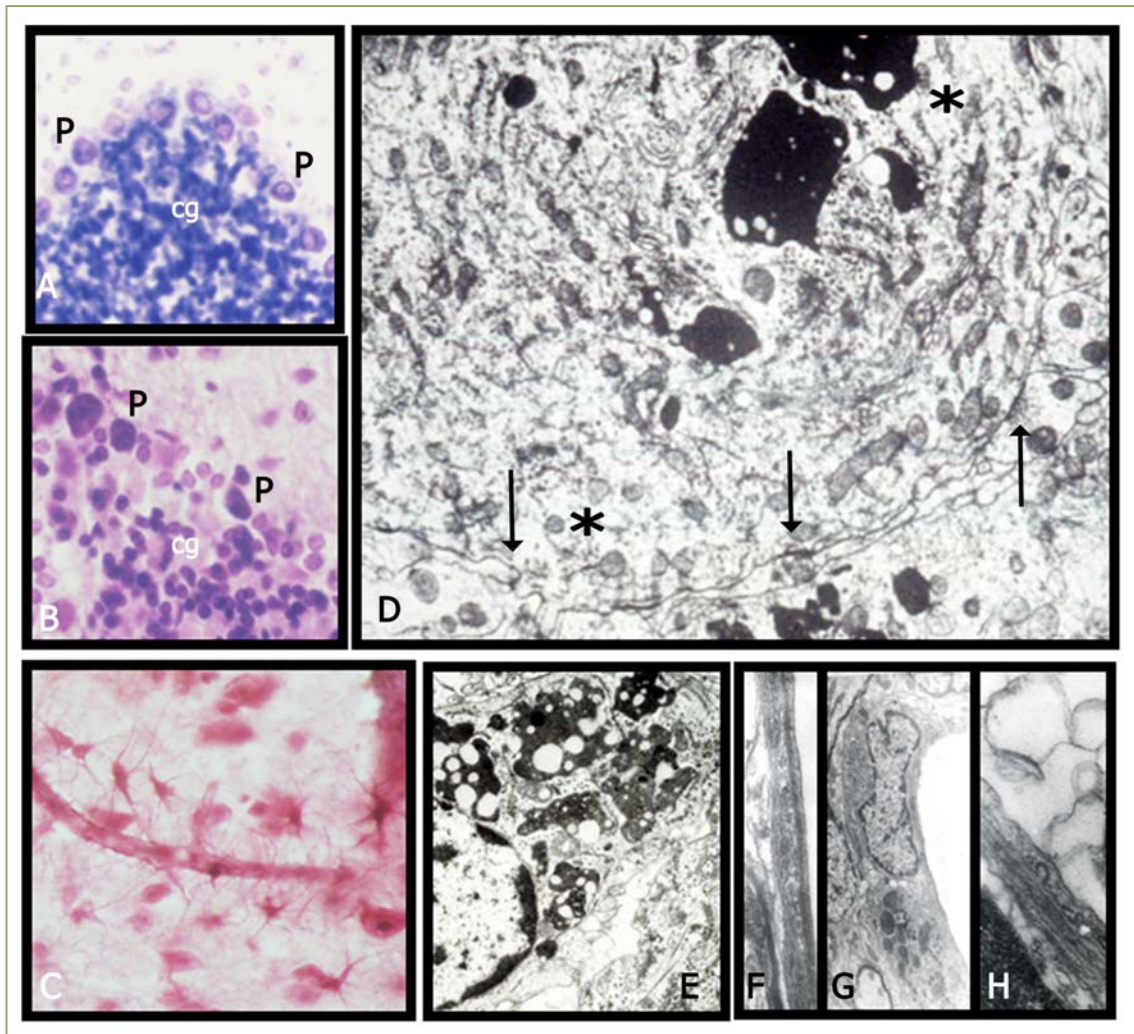


Figura 4a.- Alteraciones morfofuncionales seniles comunes en la involución cerebral senil fisiológica y patológica. De manera general puede decirse que existe pérdida neuronal y distrofia (o signos genéricos de envejecimiento celular) de las células remanentes. En **A** y **B** se muestra una laminilla cerebelosa adulta y senil, respectivamente, donde se aprecia la pérdida de neuronas de Purkinje (P) y de los granos (cg), así como las alteraciones distróficas de las células supervivientes, especialmente en las células de Purkinje que, al Microscopio Electrónico, evidencian (**D**) acumulación de lipofuscina, zonas de pérdida de organoides como Retículo Endoplásmico Rugoso y mitocondrias (*) y disminución de sinapsis (→). También sufren cambios, generalmente hipertróficos o distróficos (gliosis) las células astrogliales (**C**, con aumento de prolongaciones) y microgliales (**E**, con aumento de lipofuscina). Los vasos sanguíneos (en **F**, se observa la pared de un vaso normal), también sufren involución y muestran alteraciones como engrosamiento de la membrana basal (**H**) o signos de acumulación de sustancias de desecho (**G**, acumulaciones lipídicas).

Los criterios diagnósticos han ido variando a lo largo de los años en parte por la aparición de técnicas más específicas para la demostración de proteínas amiloideas y tau y en parte, lo que es más importante en esta revisión, porque han ido variando los conceptos sobre la EA (5, 6). Todo ello nos sitúa también en la indefinición del inicio del presumible continuum fisiopatológico senilidad normal - EA. Otros tipos de cambios morfofuncionales que pueden observarse en cerebros normales o patológicos se tratarán a continuación.

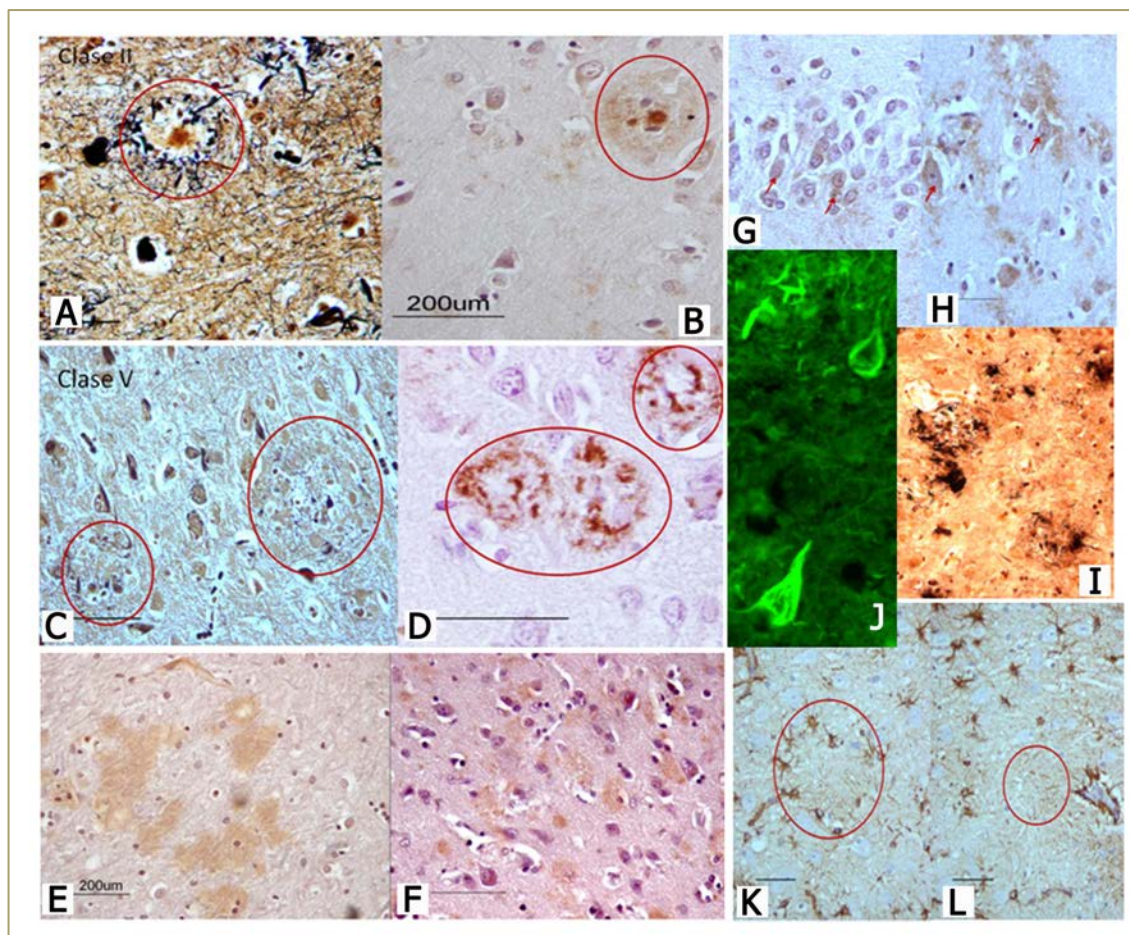


Figura 4b. Alteraciones neuropatológicas típicas del envejecimiento patológico / Enfermedad Alzheimer. A-F. Depósitos amiloides en “placa”. A, C y E, impregnaciones metálicas (Bielschowsky), y B, D y F, inmunotinciones con anticuerpos antiamiloides. Depósitos estructurados de diferente tipo en corteza frontal: en A y B, placas con “core” y corona amiloide que con la impregnación metálica permite visualizar una gran cantidad de “neuritas” distróficas que no se observan con la inmunotinción por no contener amiloide, pero sí depósitos de proteína tau aberrante. En C y D, placas multilobuladas con condensaciones de amiloide y otras masas no bien tipificadas. En E y F, “placas difusas” de amiloide de contenido granular y límites poco precisos (“masas algodonosas”). En G (*gyrusdentatus*) y H (corteza prefrontal) se muestran otros tipos de depósitos amiloides no estructurados, o “difusos”, en el neuropilo, así como depósitos intraneuronales. Todos estos tipos de depósitos diferentes parecen señalar la existencia de diferentes vías de generación de neuropatología amiloidea en el hombre durante el envejecimiento patológico, aunque la demencia EA se la vía final común (43). En J, se muestran los ovillos neurofibrilares en dos neuronas y “neuritas” distróficas en una placa amiloidea. En I, se observan células de microglía (teñidas mediante inmunorreacción frente al antígeno CD45) cuyas prolongaciones discurren por el neuropilo de la corteza parietal y penetran en las placas amiloides. En K y L, se observan astrocitos hiperreactivos contra proteína glialciclídica (signo de astrogliosis) en neuropilo de la corteza prefrontal. Su relación con las “placas” amiloides (marcadas con círculos) es variable, observándose una “corona” glial en K que no existe en la placa de la imagen L.

El término de *continuum* ha sido muy utilizado en el entorno de la EA para referirse a patogenia, evolución clínica, atención al enfermo, etc., (49, 50) ya que esta enfermedad o síndrome se caracteriza por la “progresión” de su curso evolutivo-involutivo que se manifiesta tanto porque a los síntomas iniciales en algunas áreas cognitivas se han agregado déficits de otras áreas hasta una

completa involución de las funciones cognoscitivo-comportamentales, como porque los déficits de todas las áreas progresan lentamente aunque de manera independiente. La CIE-10 considera que el diagnóstico de EA se debe emitir sólo después de un período de seis meses en el que se compruebe que la supuesta EA ha progresado desde el grado de demencia cuantificado en el primer estudio clínico.

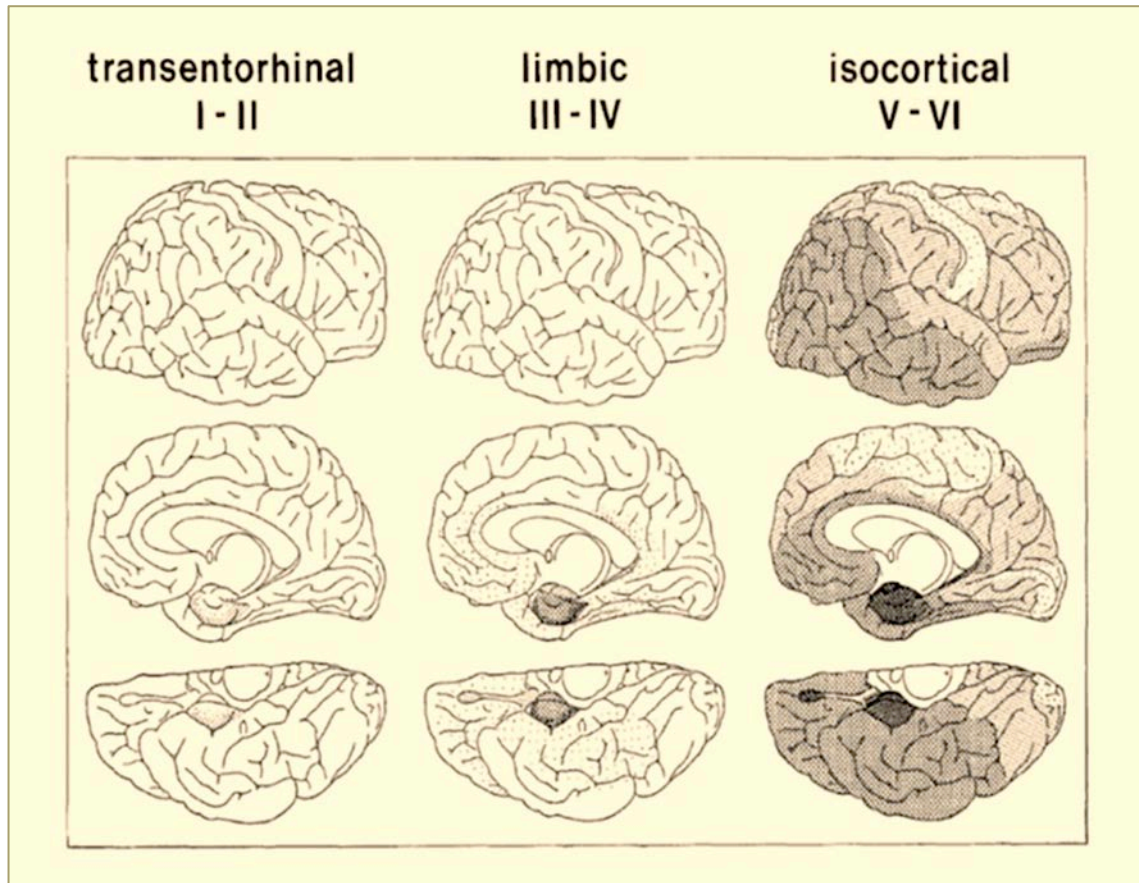


Figura 5.- Distribución del patrón de los cambios neurofibrilares (ovillos neurofibrilares y neuritas en neuropilo). Se diferencian seis estadios. En los estadios I y II las lesiones están prácticamente confinadas a la región transentorrinal. Los estadios III y IV, también llamados límbicos, presentan importantes alteraciones en la corteza límbica. Los estadios V y VI muestran alteraciones “isocorticales”. (Modificado de ref. 44).

4. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE LA INVOLUCIÓN SENIL CEREBRAL NORMAL Y PATOLÓGICA

Si la existencia o no de alteraciones neuropatológicas (depósitos de amiloide, depósitos de proteína Tau anómala en somas -ovillos neurofibrilares- o dendritas distróficas -neuritas) es un importante (aunque impreciso) hecho para concluir si un cerebro es “normal” o “anormal”, los cambios morfofuncionales que se presentan conforme avanza la edad son fundamentales tanto para entender la fisiopatología del envejecimiento como para analizar si existe una posible continuidad o secuencia de presentación y evolución de alteraciones entre el cerebro senil normal y el patológico.

CUADRO II

PRINCIPALES SIMILITUDES Y DIFERENCIAS DE ALTERACIONES ENTRE SENILIDAD NORMAL Y PATOLÓGICA (50-70, 90-118)

SIMILITUDES

- DISTROFIA Y ATROFIA NEURONALES
- PÉRDIDA NEURONAL, APOPTOSIS
- LIPOFUSCINOSIS Y ALTERACIONES DE ORGANOIDES NEURONALES
- DISMINUCIÓN DE SINAPSIS Y NEUROTRANSMISIÓN
- FENÓMENOS (NEURO)INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO
- DISMINUCIÓN DE SISTEMAS DEFENSIVOS
- DISMINUCIÓN DE SISTEMAS ADAPTATIVOS
- INVOLUCIÓN DE SISTEMAS DE ACTIVACIÓN/REGULACIÓN DE LOS NÚCLEOS BASALOCORTICALES Y RETICULARES TRONCOENCEFÁLICOS (COLINÉRGICOS, ADRENÉRGICOS, DOPAMINÉRGICOS, SEROTONINÉRGICOS)
- INVOLUCIÓN DE SISTEMAS TRÓFICOS (NGF, BDNF)
- AUMENTO DE SISTEMAS DE INVOLUCIÓN Y MUERTE NEURONAL (CITOQUINAS, CASPASAS, PROTEÍNAS PRO-APOTÓTICAS)
- ALTERACIONES DE CELULAS GLIALES y VASOS SANGUÍNEOS

DIFERENCIAS

- ACUMULACIONES PROTEICAS (DEPÓSITOS DE AMILOIDE - PLACAS, AMILOIDE DIFUSO Y AMILOIDE PERIVASCULAR-, DEPÓSITOS DE PROTEÍNA TAU -OVILLOS NEUROFIBRILARES Y NEURITAS DISTRÓFICAS-, ACUMULACIONES DE SINUCLEÍNA, UBIQUITINA, etc)
- PÉRDIDAS COGNOSCITIVAS (DEMENCIA) y TRANSTORNOS COMPORTAMENTALES
- PRESENCIA DE ISOFORMAS PATOLÓGICAS DE GENES RELACIONADOS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (dominantes: APP, Presenilinas 1 y 2; de susceptibilidad: APOE-4, CR1, ABCA-7, CD2AP, ..., más de 200)

En el Cuadro II se muestran algunos de los cambios más llamativos que se han descrito en humanos seniles con o sin demencia. Frente a una larga lista de similitudes se marcan una pequeña relación de diferencias: acumulaciones proteicas amiloideas, ovillos neurofibrilares y neuritas distróficas Tau-inmunopositivas, depósitos de alfa-sinucleína; isoformas especiales de algunos genes de susceptibilidad. Sin embargo, estas diferencias, como ya se ha dicho, no son *per se* patognomónicas de senilidad patológica/EA ya que ninguna es específica de un tipo de cerebro patológico: en bastantes cerebros seniles “normales” desde el punto de vista del deterioro cognoscitivo, aparecen depósitos de amiloide y/o Tau (51, 52) y, por otra parte, en demencias no EA existen también alteraciones que se consideraban hasta hace poco características de la EA, como los depósitos relacionados con la proteína Tau existentes en todas las tauopatías o taupatías (35, 36). Únicamente en la EA familiar existen genes específicos cuyas isoformas condicionan la aparición de la enfermedad demencial (Cuadro II) pues en la EA esporádica, muchos genes de susceptibilidad (APOE,) presentan isoformas que propician la aparición de demencia pero sin que se pueda precisar la fecha de comienzo, curso o intensidad de la patología (53, 54). Pero se puede decir que el

cuadro neuropatológico del cerebro senil patológico es similar al descrito en la mayoría de los libros sobre la EA y en las introducciones de los trabajos de investigación sobre esta enfermedad, donde se menciona la alta densidad de depósitos de amiloide y tau, la involución del sistema colinérgico basalocortical, la astrogliosis y microgliosis, el aumento del estrés oxidativo y de los elementos celulares y moleculares del proceso neuroinflamatorio, la pérdida o disfunción de las sinapsis y la involución de los sistemas neurotróficos/adaptativos frente al incremento de los sistemas de disfunción/muerte celular (25, 41, 44, 55-60).

Todas las alteraciones comunes a los dos procesos de envejecimiento (y a las entidades de envejecimiento en el límite demencia/no demencia y de EAs atípicas), existen en mayor o menor intensidad en cada proceso (aunque con mayor gravedad en la EA), pero no puede establecerse un nivel o tipo característico de involución/adaptación senil fisiológica o de neurodegeneración patológica en ninguno de ellos de una manera objetiva ni con certeza absoluta. Entre estas alteraciones comunes se encuentran: pérdida neuronal más o menos acusada en distintas regiones corticales, subcorticales y troncoencefálicas, disfunciones de sistemas basalocorticales, signos de apoptosis neuronal y elevación de sus marcadores- caspasas, proteínas pro-apoptóticas-, lisis de orgánoides subcelulares, acumulación de lipofuscina, alteraciones de la glía (astrogliosis y microgliosis) y de los vasos (acumulaciones de sustancias en lisosomas secundarios, engrosamiento de endotelio y membrana basal, esclerosis y trombosis vascular) (61-64). Hay que señalar que no todas las alteraciones se presentan en todos los centros nerviosos y que hay regiones, como el cerebelo y la corteza occipital, que parecen ser las menos vulnerables, muestran pocas diferencias involutivas, mientras otras ponen de manifiesto grandes diferencias de involución senil entre los cerebros seniles normales y patológicos, precisamente en las regiones más castigadas en la EA (hipocampo, cortex prefrontal, estructuras límbicas, núcleos basalocorticales) (25, 30, 31, 65). Aunque de una manera más teórica que científicamente comprobada, da la impresión de que sobre un substrato de cambios morfofuncionales moleculares y celulares se van desarrollando cambios patológicos conforme disminuyen los mecanismos de defensa del organismo y del propio CNS así como disminuyen los mecanismos de adaptación de las neuronas ante los insultos externos e internos (Figura 6) (66).

Las conexiones sinápticas disminuyen en gran número de circuitos, sin embargo, la pérdida de conexiones no se corresponde con la pérdida o disfunción de neuronas: en el envejecimiento senil fisiológico existe una importante neosinaptogénesis que suple la pérdida de neuronas (Figura 1) (24, 66). Como ejemplo puede citarse la proliferación de terminales axónicos en hipocampo a partir de fibras remanentes y la neoformación de espinas dendríticas en las neuronas supervivientes para reforzar la conectividad (fenómeno similar al

logrado experimentalmente en el aprendizaje y con entrenamientos tanto en animales jóvenes como seniles - 23, 24) (Figura 1).

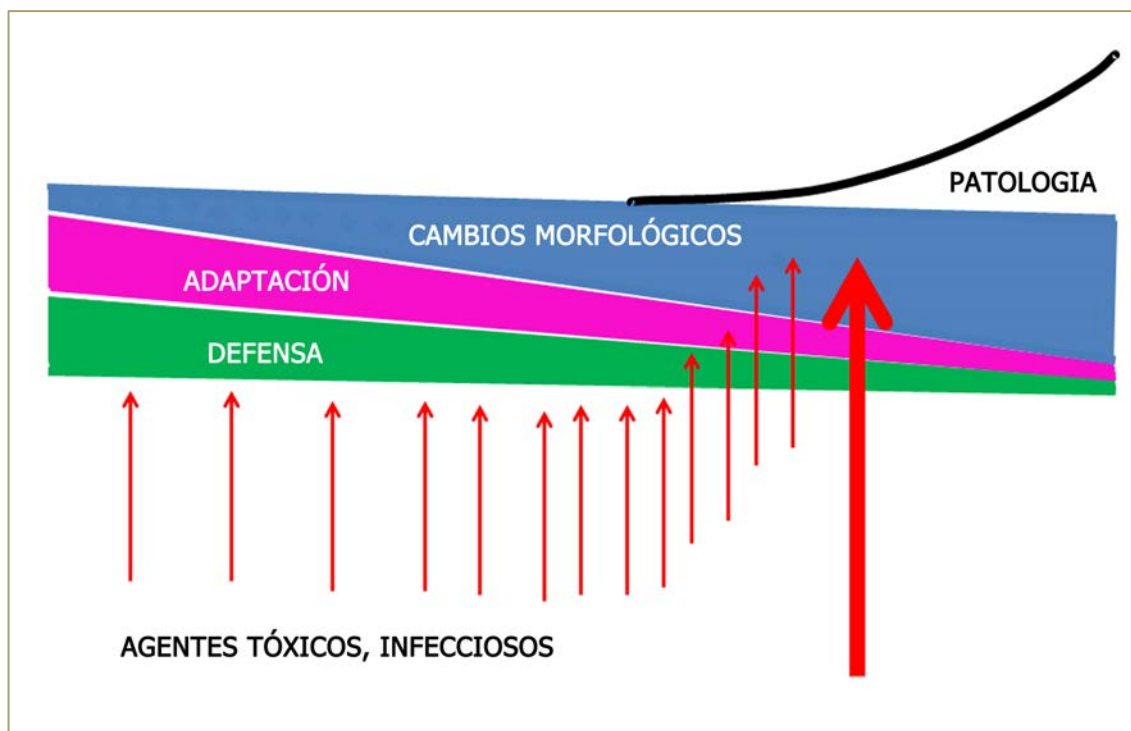


Figura 6.- Esquema que intenta resumir los posibles cambios generales acaecidos en el cerebro para propiciar el desarrollo de patología durante la senilidad. El cerebro (sus neuronas y sus células gliales) poseen sistemas y mecanismos de defensa frente a las agresiones externas e internas que evitan cambios morfofuncionales en el mismo y mecanismos de adaptación para prevenir la involución senil. Conforme avanza la edad disminuye la defensa y la adaptación con lo que se producen cambios morfológicos en neuronas y circuitos neuronales que son la manifestación de la degeneración senil. Si los agentes tóxicos e infecciosos, externos e internos rompen las barreras de defensa y adaptación, se desarrolla una involución patológica

Los sistemas neurotransmisores también presentan alteraciones seniles, fisiológicas y patológicas. En general existe una menor involución en la síntesis de receptores que de neurotransmisores, lo que es de utilidad en los posibles tratamientos con agonistas, siendo especialmente vulnerables los de las neuronas reticulares basalocorticales (colinérgicos, adrenérgicos, dopaminérgicos y serotoninérgicos) (67) (Figura 7). La involución colinérgica se ha invocado tanto para fundamentar la “disfunción geriátrica” (especialmente centrada en alteraciones de la memoria que no se corresponden con un cuadro de demencia - 61) como para explicar la EA. La teoría colinérgica de la EA es la base del tratamiento anticolinesterásico de la enfermedad (61, 68, 69), que junto a la memantina, bloqueante de receptores NMDA para glutamato, son los únicos tratamientos aprobados en la actualidad contra la EA (70). La disfunción colinérgica puede basarse en uno o varios de los siguientes problemas: a) pérdida o disfunción de las neuronas de los núcleos colinérgicos basalo corticales (*septum*, banda diagonal de Broca, *nucleus basalis magnocellularis* o núcleo de Meynert de

los primates, incluido el hombre – Figura 7, 8); b) disminución o disfunción de los axones terminales corticales que hacen disminuir la acetilcolina que mantiene el nivel óptimo de excitación de las neuronas corticales; c) disminución del sistema neurotrófico específico NGF (“nerve growth factor”) que mantiene el funcionamiento y hace responder correctamente al sistema colinérgico basalocortical (Figuras 7, 8). Esta involución colinérgica parece manifestarse con una intensidad leve a moderada en el envejecimiento fisiológico y con una intensidad moderada-grave en el envejecimiento patológico EA. En el Cuadro III y en la Figura 9, se muestran las variaciones de distintos parámetros morfológicos bioquímicos e histoquímicos del sistema colinérgico basalocortical en varias situaciones (desde el envejecimiento fisiológico a la EA terminal).

Respecto a la posible paradoja existente entre suponer que en el envejecimiento (fisiológico o patológico/EA) ocurre una bajada de neurotransmisión glutamatérgica, y emplear como tratamiento de la EA el bloqueo de receptores tipo NMDA para glutamato con el fin de limitar la funcionalidad de una parte de este complejo sistema de neurotransmisión, hay que decir que todavía quedan muchas cuestiones que aclarar sobre la posible implicación de la neurotoxicidad del glutamato, absoluta o relativa en ciertas regiones del SNC, en el origen y la progresión del envejecimiento y la EA así como de los beneficios y del mecanismo de acción del medicamento memantina, aunque haya sido internacionalmente aprobado para su uso clínico. Podría ocurrir que el bloqueo de los receptores NMDA, aunque empeorando la neurotransmisión glutamatérgica en ciertos circuitos, mejorara la concentración intracelular de calcio, que puede llegar a ser neurotóxica, al impedir el paso del catión a su través cuando se activan por el glutamato.

Para la mayoría de los investigadores, lo que caracterizaría al envejecimiento patológico (EA) sería la especial intensidad de las alteraciones junto a determinadas combinaciones de alteraciones, pero sólo en regiones específicas y tipos concretos de neuronas. Especialmente significativo es el caso de la corteza entorrinal donde parece que se producen los primeros cambios en la EA (etapa I de Baak y Braak – 44. Figura 5). Aparecen aquí los primeros ovillos neurofibrilares en las neuronas piramidales, y se detectan disminuciones del número de neuronas y del espesor de la corteza con diferentes técnicas *in vivo* e *in vitro* (47, 48, 71, 72). Ciertos estudios funcionales parecen indicar que disminuye también la conectividad sináptica y el flujo de la información a este nivel (72).

Uno de los últimos y más importante estudios para probar la hipótesis del continuum senilidad fisiológica - enfermedad de Alzheimer (EA) tanto clínica como neuropatológicamente se llevó a cabo en 2012 analizando 2.083 cerebros del National Alzheimer Coordinating Center obtenidos en autopsias desde 2005 a 2012 (55).

CUADRO III

TEORÍA COLINÉRGICA EN LA SENILIDAD Y LA EA

Cambios en parámetros morfofuncionales

	Sistema de Comunicación Colinérgico Cortical					Sistema Basalocortical colinérgico			
	Acetil-colina	CAT	ACh E	N-α7 [1]	M-1 [2]	Células nbM [CAT]	NGF [ProNGF]	TrkA	p75NTR
Senil inicial (<75a)	=/↓	=/↓	=/↓	=/↑	=	=	=	=	=
Senil avanzado (>75a)	↓	↓	=/↓	=/↓	=	= / ↓ z	=/↓	=/↓	=/↓
Al. Cog. Leve (MCI)	↓	=	=/↓	=/↑	=	= / ↓ z	=/↓ [↑]	↓	=
EA (Fase inicial)	↓	=/↓	=/↓	↑	=/↑ [concent. ↑ función]	= / ↓ z	=/↓ [↑]	↓↓	=
EA (Fase media)	↓↓	↓↓	↓	=/↑	=/↑ [concent. ↑ función]	= / ↓ z	↓ [=]	↓↓	=/↓
EA (Fase final)	↓↓	↓↓	↓↓	↓	=/↓	↓	↓ [↓]	↓↓	=/↓

Solo en 853 casos existió una buena correlación entre los datos demográficos y neuropatológicos y la valoración de la demencia mediante las pruebas del método Clinical Rating-Sum of Boxes (CDR-SB). Tanto las placas neuríticas como los ovillos neurofibrilares predijeron de modo independiente el grado de demencia obtenido por la aplicación del CDR. Pero también se asocian de forma independiente con el grado de deterioro cognoscitivo la enfermedad grave de pequeño vaso sanguíneo, severa la angiopatía amiloide grave y la esclerosis del hipocampo. Por el contrario, la educación recibida se mostró como un factor protector independiente fuerte contra deficiencias cognoscitivas. La causa de la demencia leve a moderada continúa siendo incierta en el 14% de los pacientes. Estos datos indican que las placas y los ovillos neurofibrilares contribuyen

independientemente al deterioro cognoscitivo, pero que otras enfermedades, como las vasculares, simultáneamente modifican la patología y que, también puede modificarse la expresión clínica, p. e., con la educación recibida. Por lo tanto, múltiples etiologías concomitantes pueden inducir un daño cerebral con senilidad patológica pero siguen mostrando incertidumbre sobre la existencia del continuum basándose sólo en las correlaciones clínico-patológicas entre demencia y presencia de ovillos neurofibrilares y placas.

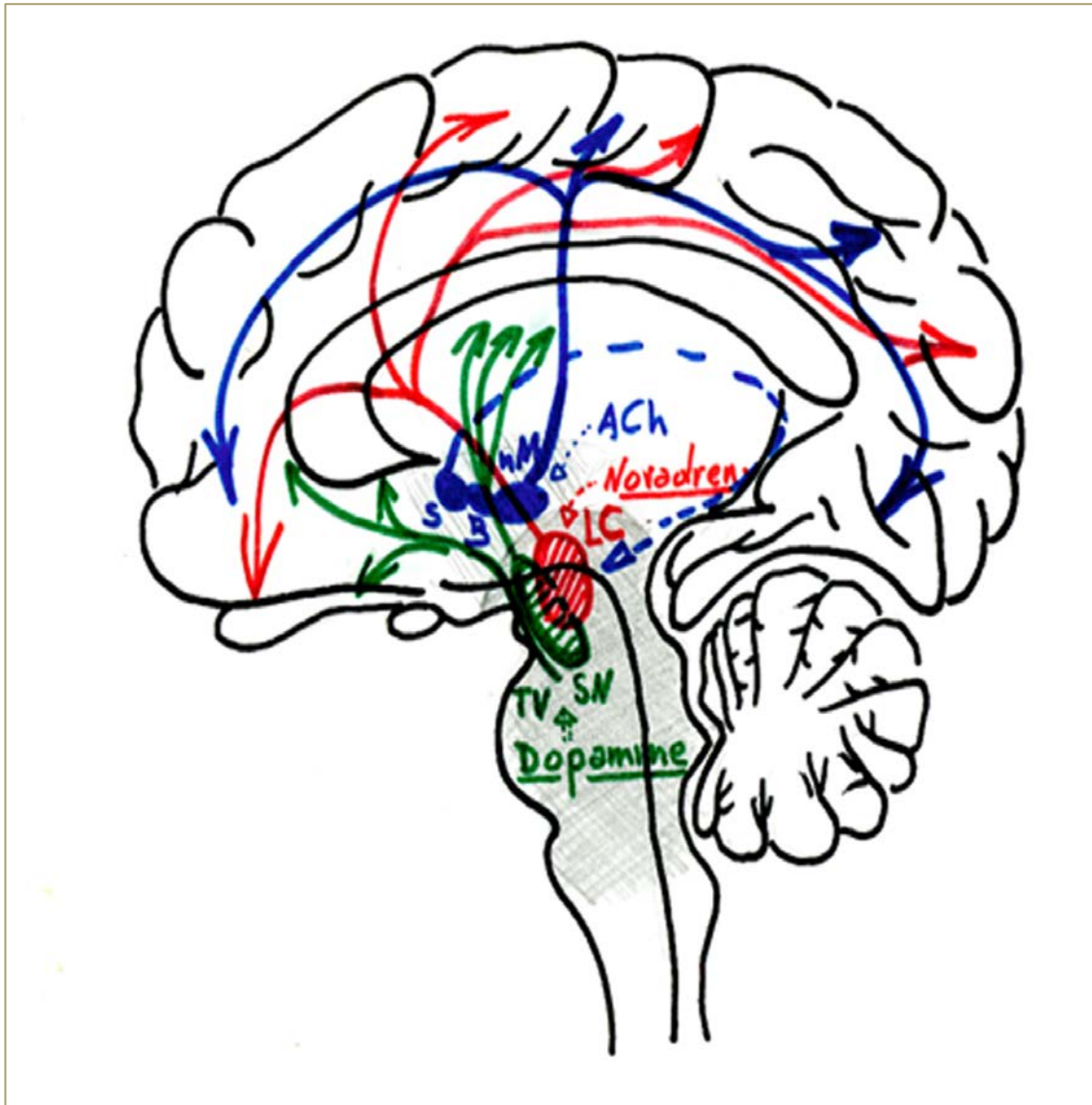


Figura 7.- Esquema donde se representan los sistemas basalocorticales y troncoencefálicos activadores que inervan la corteza cerebral del hombre (regiones sombreadas en gris): S= núcleos colinérgicos del septum que inervan, principalmente, el hipocampo; B= núcleos colinérgicos de la Banda Diagonal de Broca que inervan las áreas límbicas del cerebro; nM= núcleo de Meynert en los primates (equivalente al *Nucleus Basalis Magnocellularis* del resto de los mamíferos, donde residen los cuerpos de las neuronas colinérgicas que inervan el cortex cerebral); LC = *locus coeruleus*, donde se asientan las neuronas noradrenérgicas que inervan la corteza; SN= sustancia negra y TV= *substantia Tegmental Ventralis*, donde se asientan las neuronas dopaminérgicas que inervan la corteza.

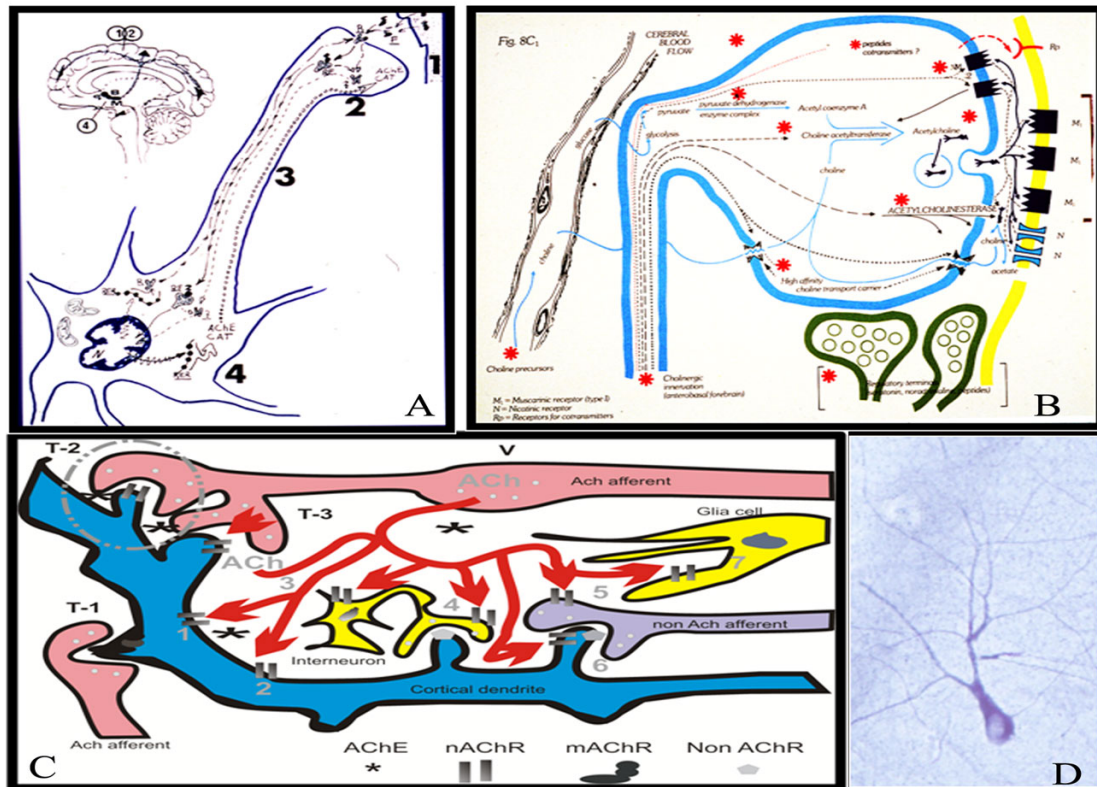


Figura 8.- Sistema Colinérgico basalocortical. Se recogen aquí diversos esquemas de los autores. En **A**, se representan los núcleos colinérgicos de la figura 7 (Septum, Banda Diagonal de Broca, Núcleo de Meynert) y una neurona colinérgica tipo con su soma en los núcleos basalocorticales (4) donde se sintetizan las enzimas colinérgicas CAT (colinacetiltransferasa), AChE (acetilcolinesterasa) que se transportan por el axón (3) hasta los terminales corticales (2) donde sintetiza y libera acetilcolina que actúa sobre las neuronas colinoceptivas (1) para mantener un estado de activación que facilite las respuestas óptimas. Estas neuronas corticales, así como las células astrogliales, sintetizan y liberan la neurotrofina NGF que es reconocida, captada y transportada retrógradamente por el axón (3) hasta el cuerpo neuronal, donde actúa sobre el núcleo de la neurona para activar la síntesis de la mayoría de los enzimas y receptores del sistema colinérgico que se transportan a los terminales corticales. En **B**, se muestra con mayor detalle el sistema colinérgico cortical donde juegan un importante papel los receptores colinérgicos nicotínicos (N) y muscarínicos (M), tanto presinápticos como postsinápticos, que sirven tanto para activar las neuronas corticales como para regular la síntesis, liberación, acción, destrucción de acetilcolina y la recaptación de colina. La colina es captada desde los capilares o de los espacios interneuronales tras la destrucción de la acetilcolina por la acetilcolinesterasa y muchos terminales colinérgicos están regulados en su funcionamiento por otros terminales aminérgicos. En **C**, se amplía el esquema sobre la "inervación colinérgica basalocortical" mostrando la enorme complejidad de la misma. Las fibras colinérgicas (ACh; ACh aferente) liberan acetilcolina especialmente en varicosidades "no sinápticas" difundiendo entre las membranas neuronales (2 neurotransmisión de "volumen" o "no sináptica", posiblemente un 80% de la acetilcolina sintetizada) y actúa sobre los receptores nicotínicos situados sobre dendritas y ramas de neuronas corticales en zonas no sinápticas (modificando las propiedades de estas neuronas), sobre interneuronas reguladoras y fibras aferentes no colinérgicas de la corteza y sobre células gliales. Otro porcentaje de acetilcolina se libera en terminales sinápticas que activan receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos. El conjunto abarca mecanismos muy complejos y sofisticados que mantienen las neuronas corticales en óptimo estado de respuesta y producen en las mismas las modificaciones necesarias para llevar a cabo los complejos funciones que son necesarios en las funciones cognitivas. Estos sistemas degeneran durante la involución senil. En **D**, se observa una neurona colinérgica hipertrófica, superviviente y aislada, mantenida por sus mecanismos de adaptación en una región del núcleo de Meynert de un individuo con Alzheimer terminal (tinción, acetilcolinesterasa).

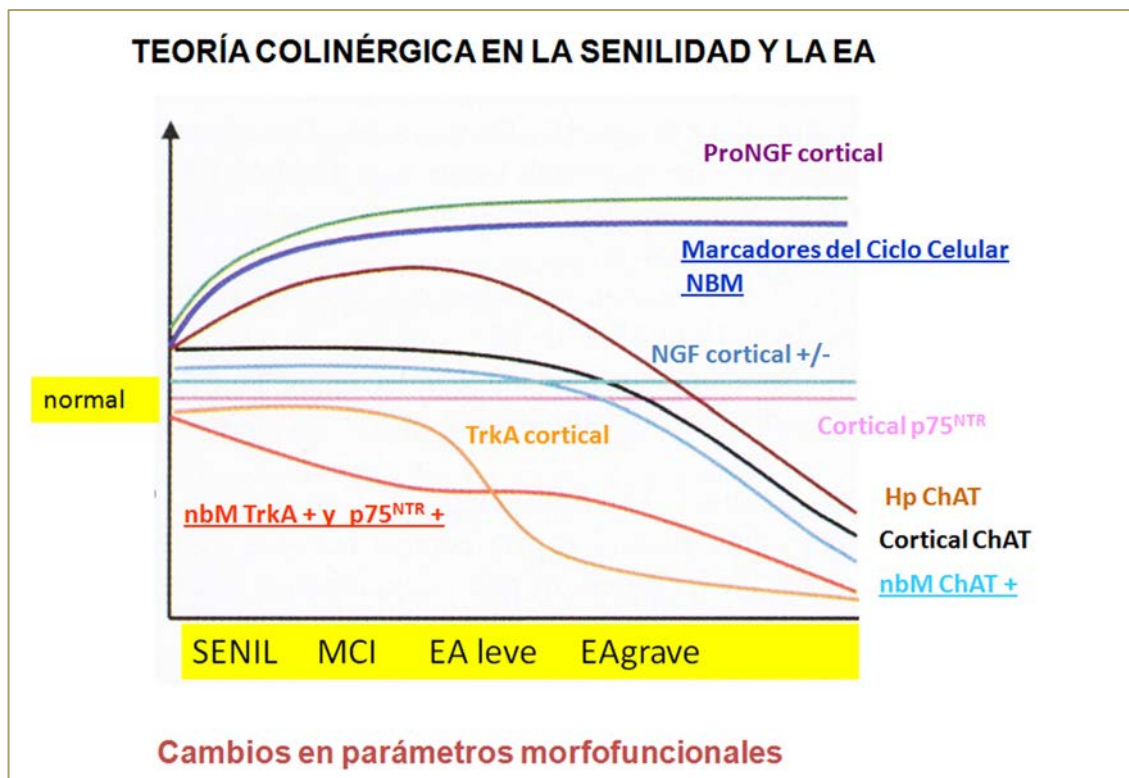


Figura 9.- Esquema sobre la evolución de los parámetros morfofuncionales en la teoría colinérgica de la senilidad y de la enfermedad de Alzheimer. Se representan algunas de los más importantes que relacionan la supervivencia y/o funcionalidad de las neuronas colinérgicas basalocorticales y del sistema NGF- neurotrófico que las mantiene con la posible evolución de la demencia Alzheimer desde la senilidad fisiológica (SENIL) al Alzheimer terminal (EA grave) pasando por el deterioro cognoscitivo leve (MCI) y el Alzheimer leve. A partir de la EA parece descender el número y/o función de las neuronas colinérgicas del núcleo de Meynert (nbM) aunque aumentar los marcadores del acto celular (indicio de degeneración neuronal) y la producción de pro NGF cortical (posible marcador de muerte celular) ya desde el inicio de la senilidad. La disfunción colinérgica se ofrece en una disminución de síntesis de colinacetyltransferasa (ChAT) productora de acetilcolina y receptores para el NGF (TrkA y p 75NTR) en el nbM. En la senilidad fisiológica y MCI parece que los mecanismos de adaptación mantienen el nivel de ChAT en hipocampo (HpChAT). El NGF cortical y los receptores p75^{NTR} para NGF corticales en la senilidad patológica/EA pueden o no sufrir disminuciones pero parece que el sistema colinérgico ya no mantiene funcionando a las células. +/- = resultados de valor muy variable en diferentes estudios; += resultados muy repetitivos en la literatura científica. Comparar con el Cuadro III. (referencias 61, 66-70, 119, 120).

5. ESTUDIOS QUE PUEDEN ACLARAR LA EXISTENCIA O NO DEL CONTINUUM FISIOPATOLÓGICO EN EL ENVEJECIMIENTO CEREBRAL

La respuesta definitiva a esta controversia vendrá dada por el conjunto de los resultados de estudios multidisciplinarios en cerebros de diferentes edades y situaciones fisiológicas y patológicas, en especial: a) controles seniles normales, b) "centenarios" humanos, c) casos que puedan ser considerados prototipos de patologías intermedias entre la senilidad normal y la patológica. Pero también será de gran ayuda estudios sobre el proceso de envejecimiento en: d) la evolución de los mamíferos (especialmente en los primates no humanos) y e) modelos

experimentales donde se induce una patología Alzheimer, especialmente en ratones transgénicos con patología Alzheimer.

a) Controles seniles “normales”.

En todos los estudios sobre envejecimiento patológico/EA se incluye un grupo control “normal” de referencia. Este grupo control se “selecciona” de tal manera que se descarta cualquier síntoma o signo de posible patología por lo que muchas veces no representa el estado morfofuncional real del cerebro senil humano sino de grupos de individuos con especial resistencia a la involución senil. Además, el mínimo porcentaje de donaciones de cerebros o de voluntarios “sanos” en los estudios clínicos hace que sea bastante difícil llevar a cabo estudios con suficiente número de individuos para establecer teóricas fases del proceso de involución. Sin embargo, en los pocos casos en que se ha podido analizar un número significativo de individuos o de cerebros seniles “normales” sin demencia se ha apreciado un gran número de subconjuntos con muy diferente grado de alteraciones morfofuncionales que podrían ser totalmente calificadas de “anormales” o “patológicas” según determinados criterios (47, 48). En un trabajo de recopilación de datos sobre pacientes “control normal” del Berkley Aging Cohort (BAC) y del Alzheimer’s Disease Neuroimagen Initiative (ADNI) (48), entre el 15 y el 20% de los casos tenían coeficientes “anormales” (EA) en parámetros como el espesor de la corteza cerebral, la captación de fluoro-deoxiglucosa (FDG-PET) y el volumen del hipocampo. Por el contrario, entre un 10 y un 25% de casos EA tenían cifras de “cerebro normal” en espesor de la corteza o consumo de glucosa, pero nunca presentaban valores normales de volumen hipocámpico (Figura 10). También estudios nuestros y de otros autores señalan porcentajes altos de “normalidad” neuropatológica en enfermos con demencia y de “anormalidad” en individuos no dementes (Figura 10). El estudio pormenorizado de estos individuos y/o cerebros post-mortem podrían darnos las claves de cuáles son los cambios morfológicos y funcionales, y los mecanismos que los propician, en la transición del posible cerebro senil normal al patológico (*continuum*). Con ellas, podría pensarse en desarrollar estrategias preventivas contra la neurodegeneración desde la senilidad normal.

b) “Centenarios” humanos.

El “envejecimiento saludable” se aprecia en un elevado porcentaje de “centenarios” (personas de más de 90, 95 ó 100 años según diversos estudios) en diversas regiones del mundo. Aunque el porcentaje de estas personas mayores con funciones cerebrales muy conservados no es el mismo en todas las regiones, en todos los países existen bastantes casos, aunque parecen más llamativas las cifras de regiones con menores índices de supervivencia (islas del Caribe, Asia, Europa del Este). Algunos estudios, aunque sobre un número no significativo de casos, sobre estos individuos viejos (“old-old” o “very old”) y sus cerebros han

encontrado alteraciones patológicas, aunque no muy intensas, en personas que no presentaban una clara sintomatología de demencia.

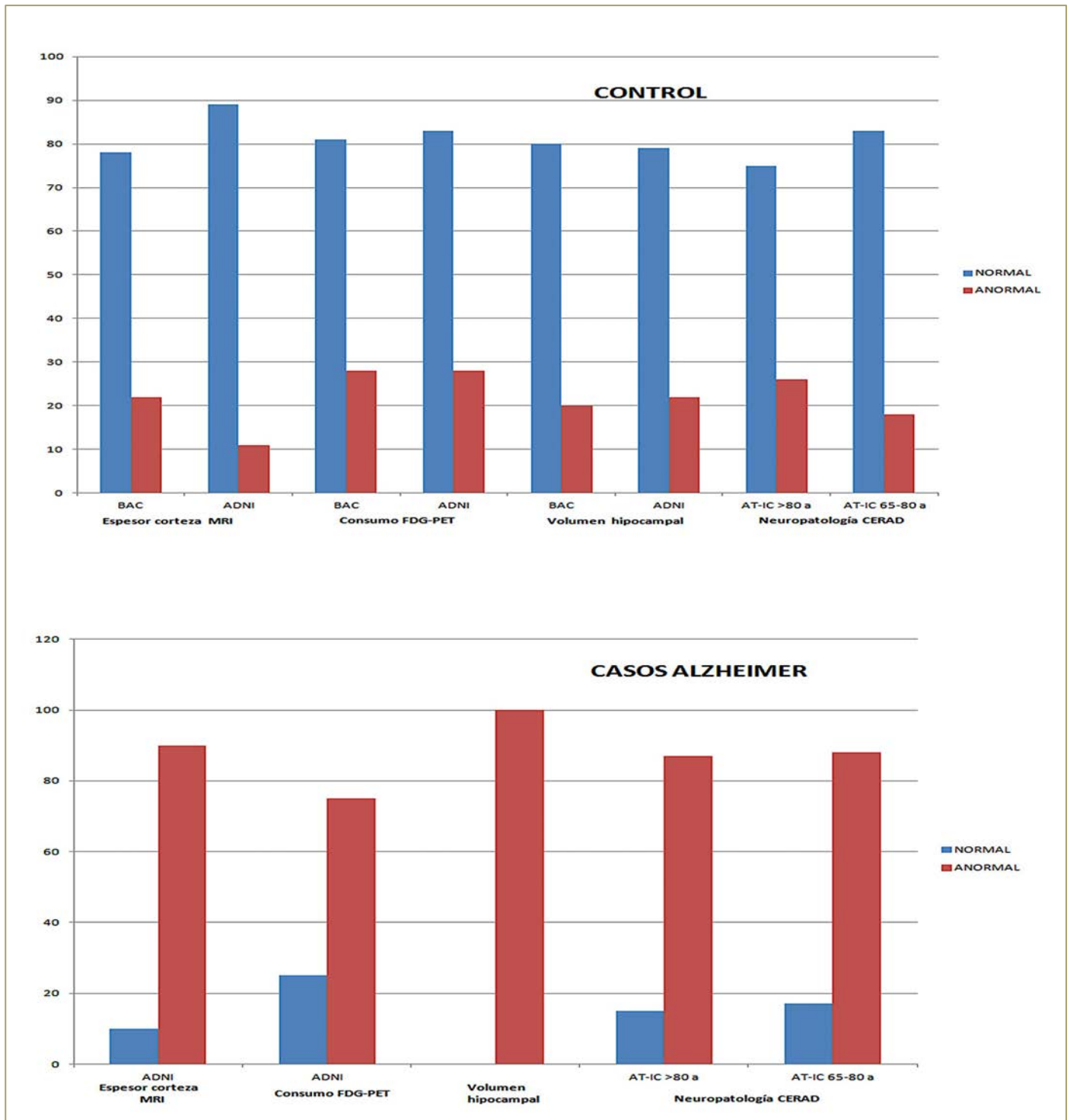


Figura 10.- Porcentajes de cerebros “normales” y “anormales” en diversos estudios, según los criterios actuales de consenso relativos a diversos parámetros tanto en grupos control senil normal como en grupos de senilidad patológica Alzheimer. Los grupos referenciados son los casos clínicos (ref. 48) de “BerkleyAgingCohort” (BAC) (72 casos) y “Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative” (ADN) (286 casos) y los cerebros post-mortem estudiados por los autores (155 casos). Los parámetros analizados son espesor de la corteza mediante resonancia magnética, consumo dedeoxiglucosa mediante tomografía de emisión de positrones (PET), volumen hipocampal mediante resonancia magnética y neuropatología Alzheimer según criterios de CERAD.

Esto parece confirmar que la presencia de alteraciones seniles que podríamos denominar patológicas no es indicativa de neurodegeneración o involución patológica/EA y avala también las resoluciones de consenso sobre la necesidad de que exista una clara densidad de alteraciones patológicas en el cerebro para un diagnóstico de “anormalidad” o patología EA. Sin embargo, nos deja sin precisar cuáles deben ser los límites exactos para separar la “normalidad” de la “anormalidad” porque no se han podido resolver los fundamentos de los cambios y de sus repercusiones. Así mismo, es de resaltar que en las personas mayores de 80 años que evolucionan hacia la EA (con signos de demencia), los cambios patológicos que se producen son menos graves que los de aquellos que inician la progresión hacia la EA en edades más tempranas, hacia los 65 años (73). En las pruebas neuropsicológicas se muestran menos “anormales” en las funciones ejecutivas mentales, en la atención y velocidad de procesamiento de la información y en la memoria inmediata. Así mismo, la disminución del espesor de la corteza en diversas regiones del cerebro (córtex cingulado, lóbulos parietal y temporal) no se aprecian diferencias frente a los ancianos “normales”. Todo esto hace que, a los niveles de discriminación diagnóstica actuales, sea muy difícil encontrar diferencias para la emisión de un diagnóstico de senilidad patológica/EA leve-inicial, pareciendo que existe una gran imbricación entre la situación morfofuncional de los cerebros “normales” y “patológicos” iniciales en los individuos mayores de 80 años.

c) Teóricos estadios patológicos intermedios entre senilidad fisiológica y patológica/EA.

Los nuevos conceptos sobre la EA asumen la existencia de un envejecimiento patológico/EA que se inicia mucho antes de que aparezcan los primeros síntomas de demencia (EA prodrómica) (5, 6). El comienzo y las primeras fases de este proceso de envejecimiento es bastante difícil de precisar con las técnicas actuales ya que no disponemos de biomarcadores específicos de EA, ni centrales ni periféricos, ni tampoco la tecnología para detectar algunos de esos posibles biomarcadores. Las técnicas de neuroimagen más avanzadas (p.e., la deposición de amiloide mediante la técnica de la Tomografía de Emisión de Positrones -PET- que usa el compuesto de Pittsburg para unirse a estos depósitos -74, 75-, o la disminución del volumen o del espesor de la corteza o de determinadas regiones del SNC, especialmente el hipocampo y el lóbulo temporal, detectada con Resonancia Magnética nuclear -RNM) no pueden visualizarnos o cuantificarnos los primeros cambios cerebrales, pues precisan que se sobrepase el límite de discriminación. Por ahora, éste se sitúa siempre en fases intermedias-avanzadas del proceso de envejecimiento patológico, cuando ya la sintomatología de demencia ha propiciado un diagnóstico de EA leve/inicial. Por otra parte, se

dispone de pocos cerebros de adultos “normales” de entre 30 y 60 años para su estudio y muy pocos de ellos se utilizan para detectar cambios sugerentes de degeneración o involución senil para que pueda concluirse de manera firme si existe un inicio hacia la senilidad patológica desde la madurez del estado adulto o bien desde la involución cerebral senil normal. En esta situación, la investigación de individuos o de cerebros que puedan ser definidos como pertenecientes a entidades patológicas intermedias entre la “normalidad” del adulto y la EA terminal, es de importancia capital. De momento sólo una entidad, la “alteración (o deterioro) cognoscitivo (o cognitivo) leve” (ACL o DCL) (“*mild cognitive impairment*”), parece estar ya asentada con criterios muy bien definidos para su diagnóstico y con definiciones bastante precisas de las alteraciones cognoscitivo/comportamentales y de algunos de los cambios en marcadores proteicos y de estrés oxidativo (7, 8). Esta entidad parece que un plazo de tres a cinco (o diez, según algunos otros autores) años evoluciona a EA, por lo que puede ser considerada como una fase intermedia de la involución patológica EA (8, 9).

Otros estadios intermedios en este curso patológico (o EA prodrómica o EA asintomática) todavía no han sido bien determinados, pero deben ser investigados aquellos subgrupos de personas que puedan aislarse de alguna manera clara cuando se hacen pruebas neuropsicológicas en los estudios epidemiológicos. En todas las pruebas neuropsicológicas se fijan “puntos de corte”, generalmente por consenso entre expertos para delimitar los individuos “normales” frente a los “anormales” de la población estudiada. Estos puntos de corte deberían ser revisados en profundidad para definir las subpoblaciones a estudiar y lograr avances en la patogenia del envejecimiento patológico.

d) Envejecimiento en la evolución de los mamíferos, especialmente de los primates no humanos.

Se ha dicho repetidamente que el problema más grave en el estudio de la EA es que no existe ningún mamífero que padezca EA de manera espontánea o inducida. Esta clásica aseveración ya no es totalmente cierta en la actualidad ya que existen algunos “modelos Alzheimer” en mamíferos que pueden ayudar a esclarecer el problema del envejecimiento normal y patológico/EA en el humano. Especialmente consideraremos en esta revisión dos modelos: uno natural, los primates no humanos, y otro experimental, los modelos transgénicos con neuropatología alzhéimer (tratados a continuación).

Aunque la proteína precursora de amiloide, APP, es una proteína ancestral de membrana que aparece evolutivamente en los primeros eucariotas y cuya función sigue sin estar clara (incluyendo su posible actuación como canal iónico, como proteína fijadora de metales como cobre, o de calcio, o como proteasa), no se presenta como fuente de patología hasta los mamíferos, especialmente de manera totalmente cierta en el hombre (76, 77). Además, a pesar de que su metabolismo

por la vías “amiloidogénica” y “no amiloidogénica” (dependiente de la catabolización por la beta-secretasa o BACE- *beta-site APP cleaving enzyme*-, o por la alfa-secretasa) (78) existe ya en casi todas las especies de mamíferos, prácticamente no aparecen depósitos amiloideos en cerebros seniles más que en los primates. Son excepcionales los casos recogidos en la literatura de animales con amiloidosis cerebrales (oso polar, conejo), sin embargo muchas especies de primates de diferente grado de evolución (prosimios, simios del nuevo mundo y simios del viejo mundo) han mostrado la formación de amiloide insoluble y su acumulación en placas estructuradas, en forma difusa en el neuropilo y en depósitos perivasculares – congofilia vascular- siempre que hayan sobrevivido en cautiverio o semilibertad, con cuidados especiales, el número de años suficiente para llegar a su “ancianidad” (76, 77). El porcentaje de simios ancianos con acumulación de amiloide varía grandemente según las especies (o las colonias de una especie estudiada: desde muy pocos individuos (<5%) hasta prácticamente todos, siendo, además, bastante controvertido el tipo y disposición de los depósitos, su relación con la amiloidosis humana en el EA y su relación con las alteraciones comportamentales propias de cada especie durante la fase senil.

Existen pocos estudios realizados de manera comparativa cognoscitiva/comportamental en vida y morfofuncional post-mortem para obtener conclusiones ya definitivas sobre envejecimiento normal y patológico, pero sí se tiene la certeza de que es un campo de estudio de gran relevancia para ello (76, 77, 79-81).

En algunos *Macacus rhesus* o *Macacus fascicularis* - macaco cangrejero o de cola larga-, estudiado por nuestro equipo de investigación, alrededor del 30% de los individuos que sobrepasan los 20 años de edad, presentan un síndrome cerebral neurodegenerativo muy acusado, similar a la EA humana, con cambios comportamentales muy profundos y gran acumulación de amiloide, frente al 70% del resto de individuos seniles con muy poco marcadas alteraciones neuropatológicas y déficits leves cognoscitivo-comportamentales (76, 77, 79) (Figura 11). Sin embargo, en otras especies, como el *Chlorocebus aethiops* - cercopiteco verde- también de la familia *macaca*, empleado en el estudio de posibles vacunas contra el Alzheimer (82, 83), todos los individuos que sobrepasaban los ocho años presentaban alteraciones neuropatológicas aunque con escasa repercusión cognoscitiva. Los estudios parecen mostrar la posible existencia de una transición entre la involución senil fisiológica y la patológica EA dentro de la cual ocurriría una fase estable sin demencia aun cuando estén presentes alteraciones neuropatológicas (77, 79).

En lo que respecta a la otra característica neuropatológica de la EA, la acumulación cerebral de agregados de proteína Tau en ovillos neurofibrilares y neuritas distróficas, especialmente la isoforma hiperfosforilizada, también hay que

reseñar que solo la especie humana tiene un alto grado de estas alteraciones. En los primates no humanos aparecen alteraciones tau-dependientes en prosimios, pero luego desaparecen hasta llegar al hombre. En algún caso se han descrito algunas acumulaciones muy débiles tau-inmunopositivas en gorilas o chimpancés (79, 84) y, en nuestro caso, en macaco cangrejero (77, 79) (Figura 11). Si se consigue hacer un seguimiento cognoscitivo-comportamental, durante el tiempo necesario, de todos los individuos de una colonia de simios con suficiente población, se podría comparar la diferente involución senil cerebral en especies con posible patología amiloide y tau (humanos, prosimios), amiloide solamente (macacos) o sin patología amiloide o tau (titís).

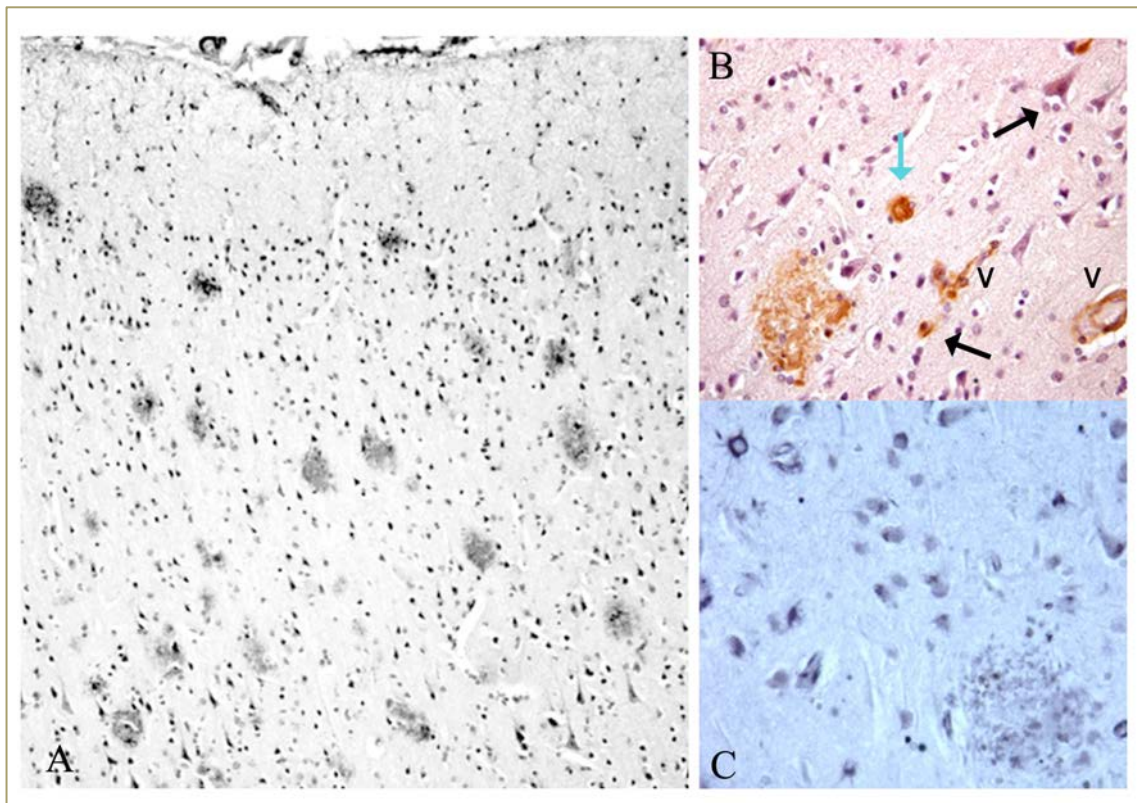


Figura 11.- Neuropatología Alzheimer en *Macacus fascicularis* (macaco cangrejero o macaco de cola larga). Individuo de 36 años de edad con profunda involución comportamental. **A.** Corteza prefrontal con gran densidad de placas amiloideas (inmunotinción con anticuerpo 6E10 intensificado con Niquel). En **B** se observa además de una placa de tipo difuso, otros tipos de depósitos amiloideos en el neuropilo (como gruesas granulaciones o microplacas de tipo “burnout” del humano) (flecha en azul), granulaciones intracelulares en neuronas y células gliales (flechas en negro) y amiloideperivascolar (congofiliopatía) (V). En **C** se observan granulaciones tau positivas (inmunotinción con anticuerpo clon tau-2) de distinto tamaño en neuronas y células gliales y en prolongaciones del neuropilo o incluidas en una placa amiloidea (A=x200; B y C = x700).

e) Modelos transgénicos de Alzheimer experimental.

En los últimos años, la biotecnología ha propiciado el uso de animales genéticamente manipulados de tal forma que en campo de la EA podemos contar con animales experimentales que expresan isoformas aberrantes de proteínas

implicadas (betaamiloide -Figura 12-, Tau) que inducen manifestaciones patológicas características de la senilidad patológica/EA. Diversos ratones transgénicos sencillos de APP (APP; APP+PSA) y Tau, o dobles y triples transgénicos (85-88) muestran como en la madurez adulta o en la senilidad se forman placas amiloideas o acumulaciones de proteína Tau. Muchos transgénicos tienen muy pocas alteraciones cognoscitivo-comportamentales, lo que ha servido para “desacreditar” estos modelos en el estudio de la senilidad patológica/EA, pero en otras es cierto que existe un mayor deterioro senil que en los controles normales (“wild type”) (87). Aunque estos ratones se han utilizado para estudios de patogenia y efectos de posibles fármacos o “vacunas” (88, 89) también nos brindan la oportunidad de estudiar las primeras fases de aparición de la patogenia y mecanismos implicados en la transición entre la “normalidad” y la “anormalidad”.

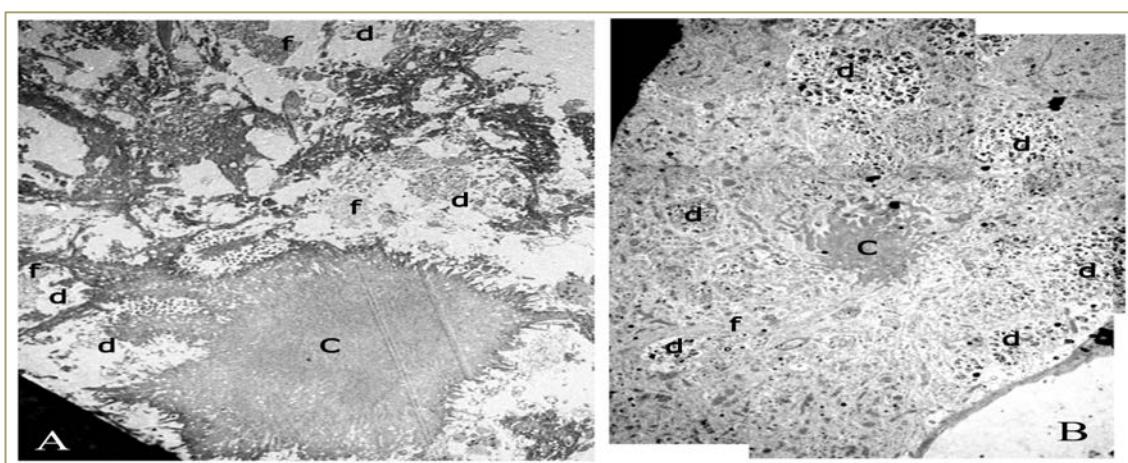


Figura 12.- Placas amiloideas observadas al Microscopio electrónico con core denso en humano (A) y en ratón transgénico APP+PS1. En ambos casos se observa el “core” central (c) formado por fibras densas de proteína beta amilideredeadas de dendritas distróficas (d) y material amilideo fibrilar difuso. Existen diferencias muy notables de técnica de estudio : 1) la técnica de estudio, pues en el caso A se trata de tejido post-mortem (3 horas), fijado por inmersión y la mayor parte de las dendritas se han vasculizado y destruido mientras se encuentran láminas ultradelgadas formadas por restos celulares neurovasales, gliales y amiloideas muy difíciles de estudiar. Por el contrario en el ratón transgénico se observan las neuritas con grandes cantidades de detritus celulares rodeadas de las láminas de amiloide puramente fibrilar-granular. 2) El tipo de amiloide, la configuración del “core” y de la “corona”, las neuritas y las prolongaciones gliales tienen diferencias en las dos especies. (x6000).

6. CONCLUSIONES

El problema teórico de si existe o no una doble vía de involución senil del cerebro, que podemos denominar, respectivamente, hacia la senilidad fisiológica o “normal” sin signos de demencia, o bien hacia la senilidad “patológica” o EA que se manifiesta por la aparición de una demencia progresiva, tiene también una muy importante repercusión práctica pues tanto la prevención como la asistencia de las personas mayores dependerán del posible número de individuos afectados: bien solamente los individuos de riesgo o bien toda la población. Los estudios ya realizados apuntan que existen características diferenciales muy marcadas entre

los cerebros seniles más decantados hacia la normalidad o hacia la EA, pero no se conoce bien el estado real de las situaciones clínico-patológicas intermedias ni los mecanismos que propician el desarrollo de la patología. Existen algunos terrenos donde la investigación podría hacer avanzar nuestros conocimientos en el envejecimiento cerebral, especialmente en el estudio pormenorizado de los individuos controles sanos de entre 30 y 60 años, en el de los “centenarios” con y sin demencia y en grupos con características diferenciales neuropsicológicas que pudieran definirse en el transcurso de estudios epidemiológicos poblacionales (posibles estadios intermedios de EA según el nuevo “lexicón” que se maneja en estos últimos años). También sería de gran interés estudiar comparativamente el envejecimiento cerebral humano con el de otras especies de mamíferos que no presentaran patología amiloide o tau y con los primates que pueden presentar patología amiloidea. En este último sentido, los animales transgénicos con patología inducida amiloide o/y tau también serían importantes fuentes de información.

7. REFERENCIAS

1. Population Reference Bureau. Cuadro de datos de la población mundial 2012. http://www.prb.org/pdf12/2012-population-data-sheet_spanish.pdf
2. World Health Organization, Alzheimer's Disease International. *Dementia: a public health priority*. WHO (OMS); Ginebra, 2012; p 12.
3. Plassman, B.L.; Langa, K.M.; Fisher, G.G.; Heeringa, S.G.; Weir, D.R.; Ofstedal, M.B.; Burke, J.R.; Hurd, M.D.; Potter, G.G.; Rodgers, W.L.; Steffens, D.C.; Willis, R.J.; Wallace, R.B. Prevalence of Dementia in the United States: The Aging, Demographics, and Memory Study. *Neuroepidemiology* **29**, 125–132 (2007).
4. Thies, W.; Bleiler, L. Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*, **9**, 208-245 (2013).
5. Dubois, B.; Feldman, H. H.; Jacova, C.; Dekosky, S. T.; Barberger-Gateau, P.; Cummings, J.; Delacourte, A.; Galasko, D.; Gauthier, S.; Jicha, G.; Meguro, K.; O'brien, J.; Pasquier, F.; Robert, P.; Rossor, M.; Salloway, S.; Stern, Y.; Visser, P. J. Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* **6**, 734-746 (2007).
6. Dubois, B.; Feldman, H. H.; Jacova, C.; Cummings, J. L.; Dekosky, S. T.; Barberger-Gateau, P.; Delacourte, A.; Frisoni, G.; Fox, N. C.; Galasko, D.; Gauthier, S.; Hampel, H.; Jicha, G. A.; Meguro, K.; O'Brien, J.; Pasquier, F.; Robert, P.; Rossor, M.; Salloway, S.; Sarazin, M.; de Souza, L. C.; Stern, Y.; Visser, P. J.; Scheltens, P. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol*, **9**, 1118-1127 (2010).
7. Lim YY, Maruff P, Pietrzak RH, Ellis KA, Darby D, Ames D, Harrington K, Martins RN, Masters CL, Szoek C, Savage G, Villemagne VL, Rowe CC; AIBL Research Group. A β and cognitive change: Examining the preclinical and prodromal stages of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* (en prensa) (Feb 28. doi: S1552-5260(13)02939-7) (2014).
8. Li, S.; Okonkwo, O.; Albert, M.; Wang, M. C. Variation in variables that predict progression from MCI to AD dementia over duration of follow-up. *Am J Alzheimers Dis* **2**, 12-28 (2013).
9. Barnes, D.E.; Cenzer, I.S.; Yaffe, K.; Ritchie, C.S.; Lee, S. J. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative; A point-based tool to predict conversion from mild cognitive impairment to probable Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014 (Feb 1. doi: S1552-5260(13)02941-5) (2014)
10. Castellani, R.J.; Perry, G. The complexities of the pathology-pathogenesis relationship in Alzheimer disease. *Biochem Pharmacol* (en prensa). doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.009 (2014).

11. Mucke, L.; Selkoe, D. J. Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network Dysfunction; Cold Spring Harb Perspect Med; **2**(7):a006338. doi: 10.1101/cshperspect.a006338 (2012).
12. Swerdlow, R. H. Alzheimer's disease pathologic cascades: who comes first, what drives what. Neurotox Res **22**, 182-194 (2012).
13. De Pedro-Cuesta, J.; Virués-Ortega, J.; Vega, S.; Seijo-Martínez, M.; Saz, P.; Rodríguez, F.; Rodríguez-Laso, A.; Reñé, R.; de las Heras, S. P.; Mateos, R.; Martínez-Martín, P.; Manubens, J. M.; Mahillo-Fernandez, I.; López-Pousa, S.; Lobo, A.; Reglà, J.L.; Gascón, J.; García, F. J.; Fernández-Martínez, M.; Boix, R.; Bermejo-Pareja, F.; Bergareche, A.; Benito-León, J.; de Arce, A.; del Barrio, J. L. 2009. Prevalence of dementia and major dementia subtypes in Spanish populations: a reanalysis of dementia prevalence surveys, 1990-2008. BMC Neurol. 9:55. doi: 10.1186/1471-2377-9-55.
14. Marín-Padilla, M. *The Human Brain: Prenatal Development and Structure*. Springer, Heidelberg, 2011.
15. Marín-Padilla, M. The mammalian neocortex new pyramidal neuron: a new conception. Front Neuroanat, **7**, 51-63 (doi: 10.3389/fnana.2013.00051) (2014).
16. Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Maloine, París, (1911) (reedición CSIC, Madrid, 1952).
17. Basak, O., Taylor, V. Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. Cell. Mol Life Sci **66**, 1057-1072 (2009).
18. Sala, C.; Segal, M. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. Physiol Rev **94**(1), 141-88 (2014).
19. Viturera, N.; Goda, Y. Cell biology in neuroscience: the interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. J Cell Biol **203**, 175-186 (2013)
20. Bhalla, U. S. Multiscale Modeling and Synaptic Plasticity. Prog Mol Biol Trans Sci **123**, 351-386 (2014).
21. Toledano, A. Mecanismos de adaptación en el Sistema Nervioso. Su importancia en la patología y la terapéutica. Anal Real Acad Farm **65**, 693-767 (1999).
22. Frol'kis, V.V.; Bezrukov, V.V. Aging of the central nervous system. Hum Physiol **4**, 478-499 (1979).
23. Connor, J.R. jr.; Diamond, M.C.; Johnson A.R.E. Aging and Environmental Influences on two types of dendritic Spines in the rat occipital cortex. Experimental Neurology **70**, 371-379 (1980)
24. Buell, S.; Coleman, P. Dendritic growth in the aged human brain and failure of growth in senile dementia. Science **206**, 854-856 (1979).
25. Organización Mundial de la Salud. *Clasificación Internacional de las Enfermedades, 10ª edición. (CIE-10). Capítulo V. Trastornos mentales y del comportamiento. Descripciones clínicas y pautas para el diagnóstico*. Meditor, Madrid, 1993, p 63.
26. Alzheimer, A. Über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. Allg Z Psychiat **64**, 146-148 (1907).
27. Kraepelin, E. *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. II. Band. Barth Verlag, Leipzig, 1910, p 21
28. American Psychiatric Association. *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales DSM IV*. Masson, Barcelona, 2002, p 149.
29. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th Edition. DSM-5*. ISBN 978-0-89042-554-1 (en prensa), 2015.
30. Khachaturian; ZS. Diagnosis of Alzheimer's Disease. Arch Neurol **42**, 1097-1105 (1985).
31. Mirra, S. S.; Heyman, A.; Mckeel, D.; Sumi, S. M.; Crain, B. J.; Brownlee, L. M.; Vogel, F. S.; Hughes, J. P.; Van Belle, G.; Berg, L. The Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD); Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. Neurology **41**, 479-486 (1991).
32. Chételat, G.; Villemagne, V. L.; Pike, K. E.; Baron, J. C.; Bourgeat, P.; Jones, G.; Faux, N.G.; Ellis, K. A.; Salvado, O.; Szoeke, C.; Martins, R. N.; Ames, D.; Masters, C. L.; Rowe, C. C. Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle Study of Ageing (AIBL) Research Group. Larger temporal volume in elderly with high versus low beta-amyloid deposition. Brain **133**, 3349-3358 (2010).
33. Leuba, G.; Saini, K.; Zimmermann, V.; Giannakopoulos, P.; Bouras, C. Mild amyloid pathology in the primary visual system of nonagenarians and centenarians. Dement Geriatr Cogn Disord **12**, 146-152 (2001).

- 34: Tolnay, M.; Calhoun, M.; Pham, H. C.; Egensperger, R.; Probst. A Low amyloid (Abeta) plaque load and relative predominance of diffuse plaques distinguish argyrophilic grain disease from Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **25**, 295-305 (1999).
- 35: Ince, P.; Irving, D.; MacArthur, F.; Perry, R. H. Quantitative neuropathological study of Alzheimer-type pathology in the hippocampus: comparison of senile dementia of Alzheimer type, senile dementia of Lewy body type, Parkinson's disease and non-demented elderly control patients. *J Neurol Sci.* **106**,142-152 (1991).
- 36 Mesulam, M. M.; Weintraub, S.; Rogalski, E. J.; Wieneke, C.; Geula, C.; Bigio, E. H. Asymmetry and heterogeneity of Alzheimer's and frontotemporal pathology in primary progressive aphasia. *Brain* (en prensa) (2014).
37. Panza, F.; Frisardi, V.; Capurso, C.; D'Introno, A.; Colacicco, A. M.; Imbimbo, B. P.; Santamato, A.; Vendemiale, G.; Seripa, D.; Pilotto, A.; Capurso, A.; Solfrizzi, V.; Late-life depression, mild cognitive impairment, and dementia: possible continuum? *Am J Geriatr Psychiatr* **18**, 98-116 (2010).
38. Wadsworth, L.P.; Lorus, N.; Donovan, N.J.; Locascio, J. J.; Rentz, D. M.; Johnson, K. A.; Sperling, R. A.; Marshall, G.A. Neuropsychiatric symptoms and global functional impairment along the Alzheimer's continuum. *Dement Geriatr Cogn Disord* **34**, 96-111 (2012).
39. Zhang, M.; Wang, H.; Li, T.; Yu, X. Prevalence of neuropsychiatric symptoms across the declining memory continuum: an observational study in a memory clinic setting. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* **2**, 200-208 (2012).
40. Rami, L.; Fortea, J.; Bosch, B.; Solé-Padullés, C.; Lladó, A.; Iranzo, A.; Sánchez-Valle, R.; Molinuevo, J. L. Cerebrospinal fluid biomarkers and memory present distinct associations along the continuum from healthy subjects to AD patients. *J Alz Dis* **23**, 319-26 (2011).
41. Hyman, B. T.; Phelps, C. H.; Beach, T. G.; Bigio, E. H.; Cairns, N. J.; Carrillo, M. C.; Dickson, D. W.; Duyckaerts, C.; Frosch, M. P.; Masliah, E.; Mirra, S. S.; Nelson, P. T.; Schneider, J.A.; Thal, D.R.; Thies, B.; Trojanowski, J. Q.; Vinters, H.V., Montine, T.J. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. Dis.* **8**, 1-13 (2012).
42. Town, T.; Nikolic, V.; Tan, J. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* **31**, 2-24 (2005).
43. Thal, D. R.; Rüb, U.; Orantes, M.; Braak, H. Phases of Abeta deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58**, 1791-1800 (2002).
44. Braak, H.; Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259 (1991).
45. Nelson, P. T.; Alafuzoff, I.; Bigio, E. H.; Bouras, C.; Braakm, H.; Cairns, N. J.; Castellani, R. J.; Crain, B. J.; Davies, P.; Del Tredici, K.; Duyckaerts, C.; Frosch, M. P.; Haroutunian, V.; HofPR.; Hulette, C.M.; Hyman, B.T.; Iwatsubo, T.; Jellinger, K. A.; Jicha, G. A.; Kövari, E.; Kukull, W. A.; Leverenz, J. B.; Love, S.; Mackenzie, I. R.; Mann, D. M.; Masliah, E.; McKee, A. C.; Montine, T. J.; Morris, J. C.; Schneider, J. A.; Sonnen, J. A.; Thal, D. R.; Trojanowski, J. Q.; Troncoso, J. C.; Wisniewski, T.; Woltjer, R. L.; Beach, T. G. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**, 362-381 (2012).
46. Josephs, K. A.; Whitwell, J. L.; Ahmed, Z.; Shiung, M. M.; Weigand, S. D.; Knopman, D. S.; Boeve, B. F.; Parisi, J. E.; Petersen, R. C.; Dickson, D. W.; Jack, C.R.; Jr. Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann Neurol* **63**, 204-12 (2008).
- 47 Toga, A. W. The clinical value of large neuroimaging data sets in Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am* **22**, 107-118 (2012).
48. Wirth, M.; Villeneuve, S.; Haase, C. M.; Madison, C. M.; Oh, H.; Landau, S. M.; Rabinovici, G. D.; Jagust, W. J. Associations between Alzheimer disease biomarkers, neurodegeneration, and cognition in cognitively normal older people. *JAMA Neurol.* **70**,1512-1519 (2013)
49. Panza, F.; Frisardi, V.; Capurso, C.; D'Introno, A.; Colacicco, A. M.; Chiloiro, R.; Dellegrazie, F.; Di Palo, A.; Capurso, A.; Solfrizzi, V. Effect of donepezil on the continuum of depressive symptoms, mild cognitive impairment, and progression to dementia. *J Am Geriatr Soc* **58**, 389-390 (2010).
50. Wright, L. K.; Litaker, M.; Laraia, M. T.; DeAndrade, S. Continuum of care for Alzheimer's disease: a nurse education and counseling program. *Issues Ment Health Nurs* **22**, 231-252 (2001).

51. Cohen, A. D.; Rabinovici, G. D.; Mathis, C. A.; Jagust, W. J.; Klunk, W. E.; Ikonovic, M. D. Using Pittsburgh Compound B for in vivo PET imaging of fibrillar amyloid-beta. *Adv Pharmacol* **64**, 27-81 (2012).
52. Armstrong, R. A. The interface between Alzheimer's disease, normal aging, and related disorders. *Curr Aging Sci* **1**, 122-132 (2008).
53. Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D.; George-Hyslop, P. H.; Pericak-Vance, M. A.; Joo, S. H.; Rosi, B. L.; Gusella, J. F.; Crapper-MacLachlan, D. R.; Alberts, M. J. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467-1472 (1993).
54. Ringman, J. M.; Coppola, G. New genes and new insights from old genes: update on Alzheimer disease. *Continuum (Minneapolis)* **19**, 358-71 (2013).
55. Serrano-Pozo, A.; Qian, J.; Monsell, S. E.; Frosch, M. P.; Betensky, R.A.; Hyman, B. T. Examination of the clinicopathologic continuum of Alzheimer disease in the autopsy cohort of the National Alzheimer Coordinating Center. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**, 1182-1192 (2013).
56. Pappolla, M. A. La Neuropatología y la Biología Molecular de la Enfermedad de Alzheimer. En: *Neuropatología. Diagnóstico y Clínica*. Cruz-Sánchez F.F., Ed.; Edimsa, Barcelona, 2000; p 543.
57. Penke, B.; Tóth, A. M.; Földi, I.; Szűcs, M.; Janáky, T. Intraneuronal β -amyloid and its interactions with proteins and subcellular organelles. *Electrophoresis* **33**, 3608-3616 (2012).
58. Delacourte, A. General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology* **40**, 33-37 (1990).
59. Dickson, C., Vickers, J. C. The morphological phenotype of b-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's. *Neuroscience* **105**, 99-107 (2001).
60. Wegiel, J.; Wang, K. C.; Tarnawski, M.; Lach, B. Microglia cells are the driving force in fibrillar plaque formation, whereas astrocytes are a leading factor in plaque degradation. *Acta Neuropathol* **100**, 356-364 (2000).
61. Bartus, R. T.; Dean, R. L.; 3rd, Beer, B. Lippa AS The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **30**, 217(4558):408-14 (1982).
62. Mann, D. M.; Yates, P. O.; Marcyniuk, B. Alzheimer's presenile dementia, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age form an age related continuum of pathological changes. *Neuropathol Appl Neurobiol* **10**, 185-207 (1984).
63. Mecocci, P. Oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: a continuum. *J Alzheimers Dis*. 2004 Apr;6(2):159-63.
64. Nixon, R. A.; Yang, D. S.; Lee, J. H. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* **4**, 590-9 (2008).
65. Toledano, A.; Álvarez, MI.; Rivas, L.; Lacruz, C.; Martínez-Rodríguez, R. Amyloid precursor protein in the cerebellar cortex of Alzheimer 's disease patients devoid of cerebellar β -amyloid deposits. Immunocytochemical study of five cases. *J Neural Trans* **106**, 1151-1169 (1999).
66. Toledano, A. Hypotheses concerning the aetiology of the Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiat* **21**, 17-25 (1988).
67. Toledano, A.; Bentura, M. Pyritinol facilitates the recovery of cortical cholinergic deficits caused by nucleus basalis lesions *J Neural Transm [P-D Section]* **7**, 195-209 (1994).
68. Drachman, D. A.; Leavitt, J. Human memory and the cholinergic system: relationship to aging? *Arch Neurol* **30**, 113-121 (1974).
69. Coyle, J. T.; Price, D. L.; De Long, M. R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* **219**, 1184-1190 (1983).
70. Schneider, L. S. Alzheimer disease pharmacologic treatment and treatment research. *Continuum (Minneapolis)*. **19**, 339-357 (2013).
71. Van Hoesen, G. W.; Augustinack, J. C.; Dierking, J.; Redman, S. J.; Thangavel, R. The parahippocampal gyrus in Alzheimer's disease. Clinical and preclinical neuroanatomical correlates. *Ann N Y Acad Sci* **911**, 254-274 (2000).
72. de Toledo-Morrell, L.; Goncharova, I.; Dickerson, B.; Wilson, R. S.; Bennett, D. A. From healthy aging to early Alzheimer's disease: in vivo detection of entorhinal cortex atrophy. *Ann N Y Acad Sci* **911**, 240-53 (2000).
73. Stricker, N. H.;(1), Chang, Y. L.; Fennema-Notestine, C.; Delano-Wood, L.; Salmon, D. P.; Bondi, M. W.; Dale, A. M. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Distinct profiles of

- brain and cognitive changes in the very old with Alzheimer disease. *Neurology* **77**, 713-21 (2011).
74. Villain, N.; Chételat, G.; Grasset, B.; Bourgeat, P.; Jones, G.; Ellis, K. A.; Ames, D.; Martins, R. N.; Eustache, F.; Salvado, O.; Masters, C. L.; Rowe, C. C.; Villemagne, V. L. AIBL Research Group. Regional dynamics of amyloid- β deposition in healthy elderly, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a voxelwise PiB-PET longitudinal study. *Brain* **135**, 2126-2139 (2012).
 75. Okello, A.; Koivunen, J.; Edison, P.; Archer, H. A.; Turkheimer, F. E.; Nägren, K.; Bullock, R.; Walker, Z.; Kennedy, A.; Fox, N. C.; Rossor, M. N.; Rinne, J. O.; Brooks, D. J. Conversion of amyloid positive and negative MCI to AD over 3 years: an 11C-PIB PET study. *Neurology* **73**, 754-760 (2009).
 76. Toledano, A.; Álvarez, M. I.; López-Rodríguez, A. B.; Toledano-Díaz, A.; Fernández-Verdecia, C. I. Does Alzheimer's disease exist in all primates? Alzheimer pathology in non-human primates and its pathophysiological implications (I). *Neurologia* **27**, 354-69 (2012) [también versión en español]
 77. Toledano, A.; Álvarez, M. I.; López-Rodríguez, A. B.; Toledano-Díaz, A.; Fernández-Verdecia, C. I. Does Alzheimer's disease exist in all primates? Alzheimer pathology in non-human primates and its pathophysiological implications (II) *Neurologia*. **29**, 42-55 (2014) [también versión en español]
 78. Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **19**, 353-356 (2002).
 79. Toledano, A.; Álvarez, M. I.; Carmona, P.; Toledano-Díaz, A.; Fernández-Verdecia, C. I. Alzheimer pathology in non-human primates and its pathophysiological implications. En: *Primates. Classification, evolution and behavior*. Hughes E. F.; Hill M. Eds. Nova Sciences Pub, New York, 2012; p 71-110.
 80. Bons, N.; Rieger, F.; Prudhomme, D.; Fisher, A.; Krause, K. H. Microcebus murinus: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav* **5**, 120-130 (2006).
 81. Voytko, M. L.; Tinker, G. P. Cognitive function and its neural mechanism in nonhuman primate models of aging Alzheimer's diseases, and menopause. *Front Biosci* **9**, 1899-1914 (2004).
 82. McGuire, M. T. The St Kitts vervet (*Cercopithecus aethiops*). *J Med Primatol* **3**, 285-297 (1974).
 83. Lemere, C. A.; Beierschmitt, A.; Iglesias, M.; Spooner, E. T.; Bloom, J.K.; Leverone, J. F. Alzheimer's disease abeta vaccine reduces central nervous system abeta levels in a non-human primate, the Caribbean vervet. *Am J Pathol* **165**, 83-97 (2004).
 84. Rosen, R. F.; Farberg, A. S.; Gearing, M.; Dooyema, J.; Long, P. M.; Anderson, D. C. Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. *J Comp Neurol* **509**, 259-270 (2008).
 85. LaFerla, F. M.; Green, K. N. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2** (11), a006320. doi: 10.1101/cshperspect.a006320 (2012).
 86. Scheffler, K.; Stenzel, J.; Krohn, M.; Lange, C.; Hofrichter, J.; Schumacher, T.; Brüning, T.; Plath, A. S.; Walker, L.; Pahnke, J. Determination of spatial and temporal distribution of microglia by 230nm-high-resolution, high-throughput automated analysis reveals different amyloid plaque populations in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **8**, 781-788 (2011).
 87. Bales, K.R. The value and limitations of transgenic mouse models used in drug discovery for Alzheimer's disease: an update. *Expert Opin Drug Discov*. **7**, 281-297 (2012).
 88. Howlett, D. R. APP transgenic mice and their application to drug discovery. *Histol Histopathol* **26**, 1611-1632 (2011).
 89. Boche, D.; Denham, N.; Holmes, C.; Nicoll, J. A. Neuropathology after active Abeta42 immunotherapy: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol* **120**, 369-384 (2010).
 90. Fjell, A.; McEvoy, M.; Holland, L.; Dale, A. M.; Walhovda, K. B. The Alzheimer's disease Neuroimaging Initiative. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol* (en prensa) (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.02.004>.
 91. Fischer, F. U.; Wolf, D.; Scheurich, A.; Fellgiebel, A. Association of structural global brain network properties with intelligence in normal aging. *PLoS One* **22**, 9 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0086258.

92. Roussotte, F. F.; Gutman, B. A.; Madsen, S. K.; Colby, J. B.; Narr, K. L.; Thompson, P. M.; Alzheimer's disease Neuroimaging Initiative (ADNI). The apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with ventricular expansion rate and surface morphology in dementia and normal aging. *Neurobiol Aging* **35**, 1309-1317 (2014).
93. Mosconi, L. Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: Methodological and physiological considerations for PET studies. *Clin Trans Imaging* **1**, doi: 10.1007/s40336-013-0026-y (2013)..
94. Nugent, S.; Tremblay, S.; Chen, K. W.; Ayutyanont, N.; Roontiva, A.; Castellano, C. A.; Fortier, M.; Roy, M.; Courchesne-Loyer, A.; Bocti, C.; Lepage, M.; Turcotte, E.; Fulop, T.; Reiman, E. M.; Cunnane, S. C. Brain glucose and acetoacetate metabolism: a comparison of young and older adults. *Neurobiol Aging* **35**, 1386-1395 (2014).
95. Kövari, E.; Herrmann, F. R.; Bouras, C.; Gold, G. Amyloid deposition is decreasing in aging brains: an autopsy study of 1,599 older people. *Neurology* **28**, 326-331 (2014)
96. Da, X.; Toledo, J. B.; Zee, J.; Wolk, D. A.; Xie, S. X.; Ou, Y.; Shacklett, A.; Parmpi, P.; Shaw, L.; Trojanowski, J. Q.; Davatzikos, C. Alzheimer's Neuroimaging Initiative. Integration and relative value of biomarkers for prediction of MCI to AD progression: Spatial patterns of brain atrophy, cognitive scores, APOE genotype and CSF biomarkers. *Neuroimage Clin.* **28**, 164-173 (2013)
97. Madhyastha, T. M.; Grabowski, T. J. Age-related differences in the dynamic architecture of intrinsic networks. *Brain Connect* **30**, (en prensa) (2014).
98. Toledano, A.; Álvarez M. I.; Toledano-Díaz,, A. Multiple neuronal and glial mechanisms can be involved in the response to the activation of nicotinic receptors. A. In: *Horizons in Neuroscience Research. Volume 3 Neural Transmissions: Characteristics, Mechanisms and Malfunctioning*, Costa, A. Villalba, E. (Eds). Nova Science Publishers, Inc.; Hauppauge, NY, pp 1-34 (2011).
99. Wolf, D.; Grothe, M.; Fischer, F. U.; Heinsen, H.; Kilimann, I.; Teipel, S.; Fellgiebel, A. Association of basal forebrain volumes and cognition in normal aging. *Neuropsychologia* **53**, 54-63 (2014).
100. Wirth, M.; Villeneuve, S.; Haase, C. M.; Madison, C. M.; Oh, H.; Landau, S. M.; Rabinovici, G. D.; Jagust, W. J. Associations between Alzheimer disease biomarkers, neurodegeneration, and cognition in cognitively normal older people. *JAMA Neurol* **70**, 1512-1519 (2013).
101. Jack, C.R Jr.; Wiste, H. J.; Weigand, S. D.; Knopman, D. S.; Lowe, V.; Vemuri, P.; Mielke, M. M.; Jones, D.T.; Senjem, M. L.; Gunter, J. L.; Gregg, B. E.; Pankratz, V. S.; Petersen, R. C. Amyloid-first and neurodegeneration-first profiles characterize incident amyloid PET positivity. *Neurology* **12**, 1732-1740 (2013).
102. Gold, P. E.; Newman, L. A.; Scavuzzo, C. J.; Korol, D. L. Modulation of multiple memory systems: from neurotransmitters to metabolic substrates. *Hippocampus* **23**, 1053-1065 (2013).
103. Negash, S.; Wilson, R. S.; Leurgans, S. E.; Wolk, D. A.; Schneider, J. A.; Buchman, A. S.; Bennett, D. A.; Arnold, S. E. Resilient brain aging: characterization of discordance between Alzheimer's disease pathology and cognition. *Curr Alzheimer Res* **10**, 844-851 (2013).
104. Shulman, J. M.; Chen, K.; Keenan, B. T.; Chibnik, L. B.; Fleisher, A.; Thiyyagura, P.; Roontiva, A.; McCabe, C.; Patsopoulos, N. A.; Corneveaux, J. J.; Yu, L.; Huentelman, M. J.; Evans, D. A.; Schneider, J. A.; Reiman, E. M.; De Jager, P. L.; Bennett, D.A. Genetic susceptibility for Alzheimer disease neuritic plaque pathology. *JAMA Neurol* **1**, 1150-1157 (2013).
105. Cha, J.; Jo, H. J.; Kim, H. J.; Seo, S. W.; Kim, H. S.; Yoon, U., Park, H.; Na, D. L.; Lee, J. M. Functional alteration patterns of default mode networks: comparisons of normal aging, amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* **37**, 1916-1924 (2013).
106. Hall, C. N.; Reynell, C.; Gesslein, B.; Hamilton, N. B.; Mishra, A.; Sutherland, B. A.; O'Farrell, F. M.; Buchan, A. M.; Lauritzen, M., Attwell, D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **26**, (en prensa) (2014) doi: 10.1038/nature13165.
107. Verkhratsky, A.; Rodríguez, J. J.; Parpura, V. Neuroglia in ageing and disease. *Cell Tissue Res* **21** (en prensa) (2014). doi: 10.1007/s00441-014-1814-z
108. Kilimann, I.; Grothe, M.; Heinsen, H.; Alho, E. J.; Grinberg, L.; Amaro, Jr. E.; Dos Santos, G. A.; da Silva, R. E.; Mitchell, A. J.; Frisoni, G. B.; Bokde, A. L.; Fellgiebel, A.; Filippi, M.; Hampel, H.; Klöppel, S.; Teipel, S. J. Subregional Basal Forebrain Atrophy in Alzheimer's Disease: A Multicenter Study. *J Alzheimers Dis* **6** (2014). doi:10.3233/JAD-132345

109. Scheff, S. W.; Neltner, J. H.; Nelson, P. T. Is synaptic loss a unique hallmark of Alzheimer's disease? *Biochem Pharmacol* **9** (en prensa) (2014). doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.028.
110. Lee, C. W.; Shih, Y. H.; Kuo, Y. M. Cerebrovascular pathology and amyloid plaque formation in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **11**, 4-10 (2014).
111. Beason-Held, L. L.; Goh, J. O.; An, Y.; Kraut, M. A.; O'Brien, R. J.; Ferrucci, L.; Resnick, S. M. Changes in brain function occur years before the onset of cognitive impairment. *J Neurosci* **13**, 18008-18014 (2013).
112. Wang, X.; Wang, W.; Li, L.; Perry, G.; Lee, H. G.; Zhu, X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. (en prensa) (2013) doi: 10.1016/j.bbadis.2013.10.015.
113. Jellinger, K. A.; Attems, J. Neuropathological approaches to cerebral aging and neuroplasticity. *Dialogues Clin Neurosci* **15**, 29-43 (2013).
114. Lefort, R.; Pozueta, J.; Shelanski, M. Cross-linking of cell surface amyloid precursor protein leads to increased β -amyloid peptide production in hippocampal neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* **32**, 10674-10685 (2012).
115. Shulman, J. M.; Chibnik, L. B.; Aubin, C.; Schneider, J. A.; Bennett, D.A.; De Jager, P. L. Intermediate phenotypes identify divergent pathways to Alzheimer's disease. *PLoS One* **5(6)**, e11244 (2010). doi: 10.1371/journal.pone.0011244.
116. Oikawa, N.; Kimura, N.; Yanagisawa, K. Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid deposition. *Brain Res* **1315**, 137-149 (2010).
117. Bell, K. F.; Ducatenzeiler, A.; Ribeiro-da-Silva, A.; Duff, K.; Bennett, D. A., Cuello, A. C. The amyloid pathology progresses in a neurotransmitter-specific manner. *Neurobiol Aging* **27**, 1644-1657 (2006).
118. Arnold, S.E.; Han, L. Y.; Clark, C. M.; Grossman, M.; Trojanowski, J. Q. Quantitative neurohistological features of frontotemporal degeneration. *Neurobiol Aging* **21**, 913-919 (2000).
119. Toledano, A.; Álvarez M. I. Lesion-induced vertebrate models of Alzheimer Dementia. En *Animal models of Dementia*; Deyn, P.P.; Van Dam, D. (Eds). Humana Press; Amsterdam, 210; pp 295-345.
120. Toledano, A.; Álvarez M. I.; Toledano-Díaz,, A. Diversity and variability of the nicotine effects on different brain cortical regions. Therapeutic and toxicologic implications. *CNS Agents Med Chem* **10**, 180-206 (2010).

La respuesta a darbepoetina-*alfa* está modulada por el binomio nutrición inflamación en pacientes en hemodiálisis

Mar Ruperto López^{1*}, Guillermina Barril Cuadrado²

¹Departamento de Nutrición Humana y Dietética. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Alfonso X el Sabio. 28691-Villanueva de la Cañada, Madrid, España. ²Servicio de Nefrología. Hospital Universitario La Princesa. Madrid, España
e-mail: marruperto@yahoo.com

Recibido el 28 de junio de 2014

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 3 (2014), pag. 540-554

Premio "Juan Abelló" en el Concurso Científico 2013 de la Real Academia Nacional de Farmacia.

RESUMEN

La anemia es un desorden multifactorial que aumenta la mortalidad en pacientes en hemodiálisis (HD). El objetivo del estudio fue investigar la relación entre el índice de resistencia a la eritropoyesis (IRE) con marcadores nutricionales-inflamatorios, y analizar si estos factores modulaban la respuesta a darbepoetina-*alfa* en 60 pacientes en HD. La muestra fue clasificada en terciles (T_n) de IRE: respondedores (T₁), respondedores intermedios (T₂), e hiporrespondedores (T₃). La hiporrespuesta a darbepoetina-*alfa* se relacionó con depleción de la masa muscular, hipoalbuminemia y síndrome de malnutrición-inflamación. La proteína C-reactiva, escala de malnutrición-inflamación y la prealbúmina sérica (P<0,05) fueron predictores independientes del IRE. La respuesta a darbepoetina-*alfa* está modulada, entre otros factores, por el binomio nutrición-inflamación elevando considerablemente el coste sanitario en pacientes en HD.

Palabras clave: Índice de resistencia darbepoetina-*alfa*; malnutrición-inflamación; síndrome de malnutrición-inflamación; hemodiálisis.

ABSTRACT***Darbepoetin-alpha responsiveness is modulated by malnutrition-inflammation binomial in hemodialysis patients***

Anemia is a multifactorial disorder which increases mortality in hemodialysis patients (HD). The aim of the study was to investigate the relationship between the erythropoiesis responsiveness index (ERI) with nutritional and inflammatory markers, and to analyze whether those factors modulating the response to darbepoetin-*alpha* in 60 HD patients. The sample was classified into ERI tertiles (T_n): responsiveness (T_1), mild responsiveness (T_2), hyporesponsiveness (T_3). Hyporesponsiveness to darbepoetin-*alpha* was significantly associated with muscle wasting, lower serum albumin levels and malnutrition-inflammation. C-reactive protein, malnutrition-inflammation score, and serum prealbumin were independent predictors of the ERI ($P < 0,05$). Responsiveness to darbepoetin-*alpha* is modulated by malnutrition-inflammation binomial which raises the cost-health in HD patients.

Keywords: Responsiveness index to darbepoetin-*alpha*; malnutrition-inflammation; malnutrition-inflammation hemodialysis.

Abreviaturas: ACT, agua corporal total; AEC, agua extracelular; AEE, agentes estimulantes de la eritropoyesis; CMB, circunferencia muscular del brazo; CV, cardiovascular; ERC, enfermedad renal crónica; EPOrHu, eritropoyetina recombinante humana; Hb, hemoglobina; HD, hemodiálisis; IMC, índice de masa corporal; IF- γ , interferón *gamma*; IL, interleucina; IRE, índice de resistencia a la eritropoyesis; *Kt/V urea (sp)*, modelo cinético de la urea compartimental; MIS, escala de malnutrición-inflamación; MM, masa muscular; PCR, Proteína C-reactiva; PCT, pliegue cutáneo tricípital; T_n , terciles; TNF- α , factor de necrosis tumoral-*alfa*.

1. INTRODUCCIÓN

La anemia es un desorden multifactorial que aumenta considerablemente la morbi-mortalidad en los pacientes en hemodiálisis (HD) (1,2). La deficiencia absoluta funcional de hierro y la síntesis endógena de eritropoyetina constituyen, entre otros factores, las principales causas de anemia. La monitorización de la anemia en la enfermedad renal crónica (ERC) requiere combinar el tratamiento farmacológico con los suplementos de hierro y los agentes estimulantes de la eritropoyesis (AEE), para alcanzar niveles de hemoglobina (Hb) de 11-12 g/dL (3).

Darbepoetina-*alfa* es una glucoproteína eritropoyética de nueva generación con moléculas de ácido siálico adicionales que confiere una semivida terminal aproximadamente tres veces más larga que la eritropoyetina recombinante humana (EPOrHu). Estudios previos (4-6) mostraron que darbepoetina-*alfa* mantenía los niveles de Hb en pacientes en tratamiento previo con EPOrHu

semanal, sin un aumento significativo de la dosis. Aunque una gran proporción de enfermos responden adecuadamente a los AEE, alrededor del 10% desarrollan resistencia al tratamiento (7). Las guías clínicas para la monitorización de anemia en ERC (3,8) definieron la hiporrespuesta a los AEE si reúne al menos una de las tres siguientes condiciones: a) niveles bajos de Hb con una dosis constante de AEE, b) aumento significativo de la dosis de AEE para mantener los niveles de Hb, y c) fracaso terapéutico para alcanzar niveles de Hb > 11 g/dL.

Ensayos clínicos randomizados (CHOIR, TREAT, CREATE) (9-11), estudiaron la respuesta a los AEE con la mortalidad en la ERC. La corrección total de la anemia con los AEE aumentó el riesgo de eventos cardiovasculares (CV), concluyendo que la normalización de Hb en la ERC no confiere beneficios adicionales en términos de supervivencia. Además, el análisis secundario del estudio TREAT (9) mostró que la hiporrespuesta a darbepoetina-*alfa* estaba asociada con aumento del riesgo CV y todas las causas de mortalidad. Varios factores causales de hiporrespuesta incluyendo inflamación sistémica, infección, hiperparatiroidismo secundario, hemólisis e inadecuación de la dosis de diálisis, han sido identificados como potencialmente modificables en la monitorización de la anemia.

El síndrome de malnutrición-inflamación es una situación prevalente en pacientes en HD que condiciona la respuesta a los AEE. Varios estudios epidemiológicos (12,13) mostraron asociación entre el índice de resistencia a los AEE (IRE) y los marcadores nutricionales e inflamatorios en pacientes en diálisis. Rattanasompattikul y col. (12) encontraron que la hipoalbuminemia y la inflamación estaban significativamente relacionadas con los requerimientos de AEE. Estudios *in vitro* o *in vivo* (14,15) sugirieron aumento de la expresión de parámetros inflamatorios como de la proteína C-reactiva (PCR), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) e interferón gamma (INF- γ) en pacientes hiporrespondedores. IL-6, IL-1, TNF- α , e INF- γ antagonizaban el efecto eritropoyético en la médula ósea (16). La inflamación podría tener un papel clave en la patogénesis de la anemia y en el desarrollo de malnutrición en pacientes hiporrespondedores. Por tanto, el binomio nutrición-inflamación puede ser un predictor independiente de la respuesta a los AEE en pacientes en HD periódica. La posible interacción entre los marcadores nutricionales e inflamatorios y la respuesta a darbepoetina-*alfa* como posible factor de riesgo modificable en HD permanece sin aclarar.

2. OBJETIVO

El objetivo del estudio fue evaluar la relación del IRE con marcadores nutricionales e inflamatorios, y analizar si estos factores aislada o conjuntamente modulaban la respuesta a darbepoetina-*alfa* en pacientes en HD.

3. PACIENTES Y MÉTODO

Diseño del estudio

Estudio observacional transversal en 60 pacientes en HD periódica, realizado en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de la Princesa de Madrid. Con carácter previo a la realización del estudio, fue obtenido el consentimiento informado de cada paciente. Se diseñaron formularios específicos para registrar los datos demográficos, clínicos, y los parámetros de laboratorio. La etiología de la ERC, comorbilidades, tipo de acceso vascular, dosis de diálisis (Kt/V *urea*) y el tiempo en HD en meses fueron obtenidos de la historia clínica de cada paciente.

Los criterios de inclusión para participar en el estudio fueron: adultos estables prevalentes en HD (tiempo en HD ≥ 3 meses) en tratamiento con darbepoetina-*alfa* (vía de administración, *sc.*) durante al menos los tres meses precedentes del inicio del estudio (fase de mantenimiento). Los pacientes con hemoglobinopatías, anemia falciforme, β -talasemia, neoplasias activas (baja expectativa de vida <6 meses), infección, trombosis del acceso vascular, infarto agudo de miocardio o enfermos sometidos a cirugía mayor o transfusiones sanguíneas en los últimos 3 meses fueron excluidos del estudio. El trabajo fue realizado según la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité de Ética del centro.

La adecuación en diálisis fue calculada por el modelo cinético monocompartimental de la urea (Kt/V *urea* $\geq 1,2$). La frecuencia y duración de la sesión de HD fue de 4 horas/3 veces por semana con agua ultrapura, siguiendo los criterios de calidad establecidos por las guías de calidad del agua en HD (17). En las sesiones de HD se utilizaron membranas biocompatibles sintéticas de alta permeabilidad (coeficiente de ultrafiltración: KuF > 20mL/min). Para valorar la severidad de las comorbilidades se utilizó el índice de comorbilidad de Charlson (18).

Tratamiento con darbepoetina-alfa e índice de resistencia a la eritropoyesis

La dosis de darbepoetina-*alfa* se expresó en $\mu\text{g}/\text{semana}$. El índice de resistencia a AEE (IRE) se calculó individualmente dividiendo el número de unidades de darbepoetina entre el peso post-diálisis en kg ($\mu\text{g}/\text{kg}$) por los niveles de Hb (g/dL) según la fórmula de Gunnell y col. (19). La corrección de la anemia se estableció en niveles de Hb entre 11-12 g/dL y/o hematocrito de 33-36% (3;8). Se consideró hiporrespuesta a los AEE cuando no se alcanzaban los niveles de Hb (11-12 g/dL) con dosis de darbepoetina-*alfa* >1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ ($\sim 100 \mu\text{g}/\text{semana}$) o aumento progresivo de los requerimientos para alcanzar el objetivo (8). Para examinar la respuesta de los AEE con marcadores clínicos, nutricionales e

inflamatorios se estratificó la muestra del IRE en terciles (T_n): T_1 , respondedores, T_2 , respondedores intermedios, y T_3 hiporrespondedores.

Valoración nutricional

La escala de malnutrición-inflamación (MIS) (20) fue utilizada como método de cribaje nutricional validado para valorar el binomio nutrición-inflamación en pacientes en HD (21). El MIS está basado en 7 componentes subjetivos (cambios en el peso post-diálisis, ingesta alimentaria, síntomas gastrointestinales, capacidad funcional, comorbilidades asociadas, signos de pérdida de tejido adiposo y muscular), y 3 componentes objetivos adicionales (IMC, albúmina sérica y capacidad total de unión al hierro). La suma de los 10 componentes del MIS (puntuación 0-30) denota la severidad del trastorno (20). En varios estudios, el MIS demostró asociación significativa con la enfermedad coronaria (22), la calidad de vida (23), la falta de apetito o anorexia (24), la hiporrespuesta a EPOrHu (25,26) y la mortalidad (21) en pacientes en diálisis. Según estudios previos (23,27), el riesgo de malnutrición-inflamación fue definido con una puntuación de MIS ≥ 5 puntos en combinación de marcadores nutricionales e inflamatorios.

Valoración antropométrica

En la valoración antropométrica se calculó el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia muscular braquial (CMB) y el pliegue cutáneo tricipital (PCT). La medición de los parámetros antropométricos se realizó en el brazo no dominante o libre de acceso vascular. Para minimizar los coeficientes de variación inter-observador, la antropometría fue realizada por un solo investigador utilizando una cinta métrica inextensible y un lipocalibre Holtain Ltd®. La masa muscular braquial fue calculada según la siguiente fórmula: $CMB (\%) = (CB - 0,314 \times PCT) \times 100$ donde CB era la circunferencia braquial y PCT era el pliegue cutáneo tricipital. Los resultados fueron comparados con los valores de referencia del percentil 50 para la población española según el sexo, edad y talla (28).

Análisis de composición corporal

La composición corporal se analizó mediante bioimpedancia vectorial (BIVA) monofrecuencia (BIVA-101®) (Akern-RJL Systems, Florence, Italy) como método previamente validado en pacientes en HD (29). El análisis fue realizado aplicando la técnica tetrapolar con electrodos desechables (Biatrodes™ 100'S. Akern), hasta los treinta minutos posteriores de haber finalizado la sesión de HD. La técnica permite conocer el patrón de hidratación (ACT, agua corporal total; AEC, agua extracelular) y la composición corporal (MM, masa muscular), entre otros componentes.

Parámetros de laboratorio

La extracción de las muestras de sangre pre-diálisis y post-diálisis fueron obtenidas a mitad de semana (día intermedio), previa a la administración de heparina en la línea de diálisis. La albúmina sérica fue analizada por el método verde de bromocresol. La PCR (*no ultrasensible*) y la prealbúmina sérica fueron medidas por inmunoturbidimetría (Roche/Hitachi 904[®]/Model P: ACN 218, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). El límite superior de los valores normales de PCR estaba fijado por el laboratorio en 1 mg/dL, y niveles por debajo de este límite se consideraron normales. Los niveles de Hb, el porcentaje de hematocrito y el perfil férrico sérico (hierro, transferrina, índice de saturación de transferrina y ferritina) fueron analizados en el laboratorio del centro por métodos rutinarios automatizados (Abbot, Aeroset[®], Diamond Diagnosis, Holliston, MA).

Análisis estadístico

Los resultados están expresados como media \pm DE o en proporciones según el tipo de variable analizada. Las variables categóricas fueron calculadas utilizando la prueba Chi-cuadrado o Mann-Whitney según la distribución de la variable. El análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para comparar la diferencia de las medias aritméticas entre los terciles (T_n) del IRE. Para investigar las interacciones entre el T_1 vs. T_3 del IRE, se utilizó el modelo general multivariante (MANOVA), y el test *a posteriori* de Bonferroni. El coeficiente de correlación de Spearman fue utilizado para evaluar las asociaciones significativas entre las variables continuas. Para explorar las variables predictoras del IRE se construyó un modelo de regresión lineal empleando el análisis por pasos sucesivos. El análisis de los coeficientes de regresión lineal permitió establecer el valor de B (coeficientes de regresión *beta* no estandarizados), coeficiente tipificado β (beta), y los intervalos de confianza al 95% (IC95%). Se aplicó la prueba de Durbin-Watson para testar la independencia entre las variables. El análisis estadístico de los datos fue calculado mediante el software SPSS versión 19.0 para Windows (SPSS[®], Inc. Chicago, IL). *P*-valor $\leq 0,05$ era considerado estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

Características clínicas, nutricionales y farmacológicas en la muestra global

En la Tabla 1 se exponen las características clínico-nutricionales de la muestra. Se estudiaron sesenta pacientes en HD, 41 hombres (68%), media de edad $68,1 \pm 14,7$ años, y tiempo medio de tratamiento en HD de $40,2 \pm 37,8$ meses. Dosis de diálisis (Kt/V *urea*) de $1,38 \pm 0,2$. El 46,7% de los pacientes se dializaba con catéter. La dosis de darbepoetina-alfa y del IRE fueron $90,2 \pm 80,6$ μg /semana y $0,13 \pm 0,14$ μg /g/kg, respectivamente. El 68,3% de los pacientes presentaban según la puntuación del MIS criterios de malnutrición-inflamación.

Tabla 1.- Características clínico-nutricionales globales en 60 pacientes en hemodiálisis^a.

VARIABLES	Total
Sexo (H/M) n (%)	41/19 (68,3/31,6)
Edad (años)	68,1 ± 14,7
DM n (%)	11 (18,3)
Acceso Vascular (Catéter) n, (%)	32 (46,7)
Tiempo tratamiento en HD (meses)	40,2 ± 37,8
Peso seco (kg)	65,2 ± 13,5
IMC (kg/m ²)	24,2 ± 4,1
PCT (%)	114,3 ± 54,4
CMB (%)	93,4 ± 11
Agua corporal total (%)	55,6 ± 6,8
Agua extracelular (%)	54,4 ± 7,4
Masa muscular (kg)	22,7 ± 6,5
Colesterol total (mg/dL)	156,4 ± 42,2
Creatinina sérica (mg/dL)	6,9 ± 2
Albúmina sérica (g/dL)	3,7 ± 0,5
Prealbúmina sérica (mg/dL)	25,9 ± 8,5
Hierro sérico (µg/dL)	66,6 ± 39,6
Transferrina (mg/dL)	171,5 ± 41,4
IST (%)	30,1 ± 17,3
Ferritina (ng/mL)	509,6 ± 432,2
Hemoglobina (g/dL)	12 ± 1,4
Hematocrito (%)	37,7 ± 5,1
Darbepoetina-alfa (µg/semana)	90,2 ± 80,6
Darbepoetina-alfa (µg/kg)	1,5 ± 1,4
IRE (µg/g/kg/)	0,13 ± 0,14
PCR (mg/dL)	2,02 ± 1,3
Escala de malnutrición-inflamación (MIS)	9,1 ± 4,8
Kt/V urea (sp)	1,38 ± 0,2

^aP-valor basado en ANOVA (Media ± DE) o Chi-Cuadrado (%). H/M, hombre/mujer; DM, diabetes mellitus; CMB, circunferencia muscular del brazo; IMC, índice de masa corporal; IRE, índice de resistencia a la eritropoyesis (darbepoetina-alfa); IST, índice de saturación de transferrina; PCR, proteína C-reactiva; PCT, pliegue cutáneo tricipital; MIS, escala de malnutrición-inflamación. #Síndrome malnutrición-inflamación (MIS ≥ 5 puntos).

Correlaciones

La Tabla 2 muestra los coeficientes de correlación de las 13 variables analizadas. El IRE tenía correlación directa con el MIS ($r = 0,41$; $P < 0,01$), y la PCR ($r = 0,32$; $P < 0,01$), mientras que estaba inversamente asociado con la prealbúmina sérica ($r = -0,60$; $P < 0,001$), y la CMB ($r = -0,37$; $P < 0,01$). La PCR mostró correlación directa significativa con MIS ($r = 0,5$; $P < 0,001$) e inversa con la albúmina ($r = -0,5$; $P < 0,001$), y la prealbúmina sérica ($r = -0,54$; $P < 0,001$).

Terciles del índice de resistencia a la eritropoyesis

Los parámetros nutricionales, antropométricos y las pruebas de laboratorio fueron analizados según la categorización del IRE en terciles (T_n) (IRE: $T_1, < 0,0433$; $T_2, 0,0434 - 0,1271$; $T_3, > 0,1271$) (Tabla 3). No se observaron diferencias significativas con el sexo, edad y diabetes mellitus como etiología primaria de ERC (18,3%) entre los 3 grupos. El IMC, PCT, CMB, y el patrón de hidratación (ACT, AEC) descendía gradualmente entre los terciles del IRE. Los pacientes

hiporrespondedores (T_3) tenían mayor proporción de síndrome de malnutrición-inflamación (90%), así como aumento significativo ~ 9 veces de los requerimientos de darbepoetina-alfa (T_1 : $0,35 \pm 0,1$; T_2 : $0,95 \pm 0,3$; T_3 : $3,2 \pm 1,4$; $P < 0,001$) comparados con el grupo de normorrespondedores y respondedores intermedios. Las concentraciones de albúmina y prealbúmina sérica tendían a ser significativamente menores en los pacientes hiporrespondedores. Aunque los niveles de PCR eran más altos en el grupo de hiporrespondedores, no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 2.- Coeficientes de correlación de Spearman en 13 variables analizadas.

	Edad	Tiempo HD	Peso (kg)	IMC	PCT (%)	CMB (%)	ACT (%)	MIS	Transferrina (mg/dL)	Albúmina (g/dL)	Prealbúmina (mg/dL)	PCR (mg/dL)
Edad												
Tiempo en HD (meses)	-0,02											
Peso (kg)	0,04	0,13										
IMC	0,06	0,19	0,78 ^a									
PCT (%)	0,09	0,22	0,53 ^a	0,67 ^a								
CMB (%)	-0,16	0,12	0,66 ^a	0,71 ^a	0,42 ^b							
ACT (%)	-0,03	-0,23	0,56 ^a	-0,41 ^b	-0,53 ^a	-0,22						
MIS	0,11	-0,02	-0,40 ^b	-0,38 ^b	-0,47 ^a	-0,52 ^a	0,14					
Transferrina (mg/dL)	-0,01	-0,03	0,08	-0,008	0,03	0,16	0,25 ^c	-0,38 ^b				
Albúmina (g/dL)	-0,22	0,22	0,30 ^c	0,32 ^c	0,39 ^b	0,45 ^a	-0,17	0,70 ^a	0,22			
Prealbúmina (g/dL)	-0,12	0,12	0,41 ^b	0,36 ^b	0,34 ^b	0,52 ^a	-0,10	0,69 ^a	0,44 ^b	0,60 ^a		
PCR (mg/dL)	0,02	-0,01	-0,10	-0,07	-0,28 ^c	-0,30 ^c	0,11	0,50 ^a	-0,46 ^a	-0,50 ^a	-0,54 ^a	
IRE ($\mu\text{g/g/kg}$)	-0,01	-0,27 ^c	-0,40 ^b	-0,36 ^b	-0,45 ^a	-0,37 ^b	0,13	0,41 ^b	-0,39 ^b	-0,38 ^b	-0,60 ^a	0,32 ^b

ACT, agua corporal total; CMB, circunferencia muscular del brazo; HD, hemodiálisis; IMC, índice de masa corporal; IRE, índice de resistencia a la eritropoyesis (darbepoetina-alfa); MIS, escala de malnutrición-inflamación; PCR, proteína-C reactiva; PCT, pliegue cutáneo tricípital; a $P < 0,001$, b $P < 0,01$ y c $P < 0,05$.

Analizando la interacción entre los terciles (T_1 vs. T_3), observamos un aumento significativo de los requerimientos de darbepoetina-alfa expresados tanto en $\mu\text{g/kg}$ como en $\mu\text{g/semana}$, así como mayor IRE en el T_3 . La hiporrespuesta a AEE (T_3) estaba asociada significativamente a depleción de masa muscular, hipoalbuminemia e inflamación comparada con los pacientes normorrespondedores (T_1).

Marcadores nutricionales-inflamatorios como predictores del índice de resistencia a darbepoetina-alfa

En la Tabla 4 se exponen los factores predictores del IRE. En el modelo de regresión lineal utilizando como variable dependiente el IRE se incluyeron PCR, MIS, prealbúmina, edad y tiempo de tratamiento en HD. PCR ($\beta=0,2$) y MIS ($\beta=0,24$) estaban directamente relacionados con el IRE. Adicionalmente, prealbúmina sérica ($\beta=-0,4$), edad ($\beta=-0,20$) y el tiempo de tratamiento en HD ($\beta=-0,23$) fueron también predictores independientes negativos de la respuesta a

Tabla 3.- Características clínico-nutricionales en 60 pacientes en hemodiálisis según los terciles del índice de resistencia a la eritropoyesis^a

Variables	T ₁ : respondedores (n = 20)	T ₂ : respondedores intermedios (n = 20)	T ₃ : hiporrespondedores (n = 20)	P-valor	*Interacción T ₁ vs. T ₃
Sexo (H/M) n (%)	15/5 (75/25)	12/8 (60/40)	14/6 (70/30)	0,58	>0,05
Edad (años)	70,2 ± 13,6	64,7 ± 14,9	69,3 ± 15,7	0,46	>0,05
DM n(%)	5 (45,6)	3 (27,2)	3 (27,2)	0,73	0,9
Acceso Vascular (Catéter) n, (%)	12 (37,5)	8 (25)	12 (37,5)	0,37	0,37
Tiempo tratamiento en HD (meses)	44,9 ± 38,6	43,1 ± 41	32,7 ± 40,2	0,55	0,94
Peso seco (kg)	74 ± 17,4	63,3 ± 7,2	58,2 ± 8,3	<0,001 ^a	<0,001 ^a
IMC (kg/m ²)	26,5 ± 5,2	23,7 ± 3	22,3 ± 2,7	0,004 ^b	0,003 ^b
PCT (%)	152,3 ± 59,5	101,7 ± 41	89 ± 40,1	<0,001 ^a	<0,001 ^a
CMB (%)	97,7 ± 11,4	95,5 ± 9,1	86,9 ± 9,6	0,003 ^a	0,004 ^b
Agua corporal total (%)	55,2 ± 7,4	55,1 ± 7,3	56,5 ± 5,9	0,83	0,84
Agua extracelular (%)	52,9 ± 8,5	53,7 ± 7,3	56,6 ± 6,6	0,38	0,51
Masa muscular (kg)	24,6 ± 7,3	23,7 ± 6,4	19,6 ± 4,4	0,03 ^c	0,04 ^c
Colesterol total (mg/dL)	181,6 ± 45,1	149,1 ± 31,4	138,4 ± 37,9	0,002 ^b	0,002
Creatinina sérica (mg/dL)	6,6 ± 2,1	8 ± 2,3	6,4 ± 1,5	0,02 ^c	<0,05 ^b
Albúmina sérica (g/dL)	3,9 ± 0,4	3,7 ± 0,5	3,5 ± 0,3	0,01 ^b	0,01 ^b
Prealbúmina sérica (mg/dL)	29,6 ± 5,9	27,7 ± 10,2	20,4 ± 6,1	<0,001 ^a	0,001 ^a
Hierro sérico (µg/dL)	76,1 ± 55,7	63,5 ± 26,7	60,4 ± 31,1	0,45	0,72
Transferrina (mg/dL)	187,3 ± 33,3	176,8 ± 35,7	152,1 ± 46,7	0,02 ^c	0,02 ^c
IST (%)	31,8 ± 19	26,1 ± 11,1	32 ± 19,7	0,22	0,5
Ferritina (ng/mL)	456,3 ± 413,6	440,1 ± 410,8	636,4 ± 465,9	0,30	0,6
Hemoglobina (g/dL)	12,2 ± 1,2	12,2 ± 1,2	11,7 ± 1,7	0,39	0,84
Hematocrito (%)	38 ± 5	38 ± 1	36,7 ± 6,1	0,79	0,4
Darbepoetina-alfa (µg/semana)	26,2 ± 12	60,5 ± 22,7	184 ± 70,8	<0,001 ^a	<0,001
Darbepoetina-alfa (µg/kg)	0,35 ± 0,1	0,95 ± 0,3	3,2 ± 1,4	<0,001 ^a	<0,001
IRE (µg/g/kg/)	0,028 ± 0,009	0,078 ± 0,025	0,28 ± 0,15	<0,001 ^a	<0,001
PCR (mg/dL)	1,7 ± 1,1	1,8 ± 1,4	2,5 ± 1,7	0,12	0,15
Escala de malnutrición- inflamación (MIS)	7,4 ± 3,7	8,1 ± 5,6	11,8 ± 3,9	0,007 ^b	0,01 ^a
Kt/V urea (sp)	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,3	0,53	>0,05
Índice de comorbilidad de Charlson	7,9 ± 2,8	8,1 ± 3,6	9,4 ± 3,4	0,31	0,47
Síndrome malnutrición- inflamación n (%) [#]	13 (65)	10 (50)	18 (90)	0,3	0,36

^aP-valor basado en ANOVA (Media ± DE) o Chi-Cuadrado (%). *Comparación post-hoc (Bonferroni). T₁, normorrespondedores; T₂, respondedores intermedios; T₃, hiporrespondedores. H/M, hombre/ mujer; DM, diabetes mellitus; CMB, circunferencia muscular del brazo; IMC, índice de masa corporal; IRE, índice de resistencia a la eritropoyesis (darbepoetina-alfa); IST, índice de saturación de transferrina; PCR, proteína C-reactiva; PCT, pliegue cutáneo tricipital; MIS, escala de malnutrición-inflamación. [#]Síndrome malnutrición-inflamación (MIS ≥ 5 puntos).

darbepoetina-*alfa* en el modelo de regresión lineal. El valor del test de Durbin-Watson fue 1,50. El poder predictivo del coeficiente de regresión (R), explicó el 76% de la varianza con las variables incluidas en el modelo de regresión lineal. R² y R² corregida fueron 0,58 y 0,53, respectivamente.

Tabla 4.- Predictores del índice de resistencia a la eritropoyesis relacionados con el binomio malnutrición-inflamación en 60 pacientes en hemodiálisis^a

Predictores	B	β	ET	IC95%		P-valor
				Inferior	Superior	
Edad (años)	-0,002	-0,11	0,001	-0,004	0,000	0,050
Tiempo en HD (meses)	-0,001	-0,23	0,000	-0,002	0,000	0,015
Prealbúmina (mg/dL)	-0,007	-0,40	0,002	-0,011	-0,003	0,001
Proteína-C reactiva (mg/dL)	0,012	0,20	0,006	0,000	0,023	0,040
Escala de malnutrición-inflamación (MIS)	0,008	0,24	0,004	0,000	0,016	0,040
Constante	0,53		0,105	0,32	0,74	0,00

^aÍndice de Resistencia a la eritropoyesis ($\mu\text{g/g/kg}$) calculado según la fórmula: [número de unidades de darbepoetina-*alfa* (semana)/hemoglobina (g/dL)]/ Peso (kg). B, coeficientes de regresión *beta* no estandarizados; β , coeficiente tipificado *beta*; ET, error típico; IC95%, intervalo de confianza 95%. R = 0,76; R² = 0,58; R² corregida = 0,53. Durbin-Watson = 1,50.

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio en 60 pacientes en HD la combinación de los marcadores nutricionales e inflamatorios eran predictores independientes de la respuesta a darbepoetina-*alfa*. Considerando que la monitorización del binomio nutrición-inflamación en pacientes en HD, puede condicionar y/o modular la respuesta a los AEE, estos hallazgos pueden tener relevancia clínica para optimizar la eficacia terapéutica en la corrección de la anemia.

Nuestros resultados indican que el IRE se correlacionaba directa y significativamente con el MIS y la PCR, sugiriendo que ambos parámetros participaban en la respuesta a darbepoetina-*alfa*. Kilpatrick y col. (30) concluyeron que el IRE es un factor pronóstico de mortalidad. Kalantar-Zadeh y col. (26) observaron que por cada aumento de 5 unidades en el MIS, el riesgo de hiporrespuesta a EPOrHu era del 64%. En los pacientes hiporrespondedores valores de MIS > 5 puntos estaban significativamente asociados con catabolismo muscular e inflamación. El impacto de la malnutrición-inflamación en la eritropoyesis parece depender, entre otros factores, de los depósitos de hierro, y del balance de las diferentes citocinas en el medio urémico, más que de los niveles de un solo marcador y/o tratamiento aislado; concentraciones elevadas de IL-1 y TNF- α inhiben la producción de eritropoyetina *in vitro* (31), y los niveles altos de IL-6, PCR y TNF- α tienen un efecto supresor en la proliferación y maduración de las células precursoras eritrocitarias, bloqueando el metabolismo del hierro. En

nuestro estudio los pacientes con alta concentración de PCR requerían mayores dosis de darbepoetina-*alfa* para alcanzar niveles de Hb entre 11-12 g/dL. El 50% de los pacientes hiporrespondedores tenían niveles de Hb < 11g/dL, aunque necesitaran hasta 7 veces más unidades de darbepoetina-*alfa* por semana comparado los normorrespondedores (datos no mostrados). Barany y col. (13) observaron que la dosis semanal de Epo fue 80% mayor en pacientes con PCR \geq 20 mg/dL. Goicoechea y col. (32) obtuvieron correlación significativa entre IL-6 y TNF- α y la dosis de EPOrHu en 34 pacientes en HD. Gunnell y col. (19) encontraron en 92 pacientes en HD que la PCR y la ferritina sérica eran predictores de resistencia a EPOrHu. En el estudio RISCAVID (33) mostraron que la IL-6 era un predictor independiente del IRE, aunque no observaron el mismo efecto con la PCR. En nuestro estudio la PCR tenía correlación inversa con la transferrina y la prealbúmina, siendo ambos significativos en el análisis estadístico multivariante. Los resultados del presente estudio concuerdan los datos publicados por otros autores (19,33,34), donde se observa que el aumento de la PCR se relaciona con peor respuesta a los AEE medido a través del IRE.

El síndrome de malnutrición-inflamación es una condición frecuente identificada hasta en el 75% de los pacientes prevalentes en HD (1,35). Varios autores (12,33,36) mostraron que el síndrome de malnutrición-inflamación era un factor predictivo de hiporrespuesta a los AEE. En nuestro estudio la prevalencia global de malnutrición-inflamación era del 68%, en consonancia con los trabajos precedentes en diálisis (1,12,33,35,36). Sin embargo, cabe destacar que el 90% de los pacientes hiporrespondedores tenían síndrome de malnutrición-inflamación. La triada anemia-malnutrición-inflamación era un modelo dinámico integrado por la combinación de las variables incluidas en el modelo de regresión. El IRE mostró relación significativa con la edad, el tiempo de tratamiento en HD, los marcadores nutricionales (MIS, prealbúmina sérica) y la inflamación (PCR). La alteración de biomarcadores inflamatorios, como la PCR, y marcadores nutricionales (albúmina sérica < 3,8 g/dL o prealbúmina sérica <28 g/dL) fueron asociados con la hiporrespuesta a darbepoetina-*alfa*. El IRE era un predictor independiente del síndrome de malnutrición-inflamación. La combinación de las variables explicaba el 76% de la resistencia a darbepoetina-*alfa* en el modelo de regresión lineal, sugiriendo que el binomio nutrición-inflamación condicionaba la respuesta a darbepoetina-*alfa*. Por tanto, los resultados del presente estudio también confirman la relación entre anemia-nutrición-inflamación observada por otros autores (12,26,33) en pacientes en HD, aunque todavía permanece sin aclarar la contribución de cada uno de ellos en la respuesta a los AEE. En la práctica clínica, al monitorizar la respuesta a darbepoetina-*alfa*, si existe hiporrespuesta sería mandatorio considerar entre los posibles factores etiopatogénicos el binomio nutrición-inflamación.

Otra de las finalidades de nuestro estudio fue identificar cuantitativamente la relación coste-eficacia de la darbepoetina-*alfa* en pacientes en HD. Cuesta y col. (37) estimaron mediante el análisis de minimización de costes, el precio medio de un μg de darbepoetina-*alfa* en 1,317987 €. Analizando en términos económicos el coste de la triada malnutrición-inflamación e hiporrespuesta a darbepoetina-*alfa*, obtuvimos una diferencia media de ~ 900 €/semana/paciente comparado con el grupo de normorrespondedores y respondedores intermedios. Adicionalmente, los resultados del estudio muestran que la malnutrición-inflamación, además de aumentar los requerimientos de darbepoetina-*alfa*, también eleva considerablemente el gasto sanitario.

Las limitaciones del presente trabajo incluyen el propio diseño experimental de carácter transversal en el que sólo se puede evaluar la asociación entre las variables analizadas, aunque no se puede establecer longitudinalmente la relación entre el síndrome de malnutrición-inflamación y la resistencia a darbepoetina-*alfa*. En nuestro estudio, no analizamos los niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias y, por tanto, los resultados están limitados a la concentración de PCR como marcador inflamatorio. Además, es necesario considerar que tanto los marcadores nutricionales como inflamatorios pueden sufrir fluctuaciones en cortos periodos de tiempo en pacientes en HD. Otra limitación potencial del estudio fue no registrar los niveles de vitamina B₁₂ y ácido fólico, y a los pacientes en tratamiento farmacológico con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, sevelamer o estatinas. En contraste, las fortalezas del estudio incluyen: a) la utilización de agua ultrapura para optimizar la respuesta a los AEE, evitar la retrofiltración, y minimizar el estímulo inflamatorio dependiente de la calidad de agua en diálisis. La utilización de agua ultrapura está relacionada con menores niveles de marcadores bioinflamatorios (IL-6 y PCR), así como una mayor respuesta a los AEE en pacientes en HD (38); b) utilización de membranas biocompatibles de alta permeabilidad en las sesiones de HD. Panichi y col. (39) concluyeron que la utilización de membranas de polisulfona recubiertas con vitamina E reducía significativamente el IRE en HD periódica; y c) evaluación del estado nutricional e inflamatorio incluyendo análisis de composición corporal medido por bioimpedancia eléctrica, parámetros de laboratorio, y la adecuación de diálisis.

6. CONCLUSIONES

En resumen, nuestro estudio demuestra que la respuesta a darbepoetina-*alfa* está modulada por marcadores nutricionales e inflamatorios. Los pacientes hiporrespondedores requerían ~ 9 veces más unidades de darbepoetina-*alfa* cuando coexistía con malnutrición-inflamación. El coste anual estimado de la triada anemia refractaria, malnutrición e inflamación asciende a ~ 43.000 € por

paciente/año. Las intervenciones terapéuticas dirigidas a aminorar o corregir los efectos adversos asociados a la corrección de anemia -deficiencia de hierro, malnutrición, anorexia urémica, e inflamación pueden mejorar la respuesta a los AEE y la morbi-mortalidad asociada a estos procesos en pacientes en HD. Nuevos trabajos de investigación son necesarios para esclarecer longitudinalmente los factores causales de malnutrición-inflamación en la hiporrespuesta a los AEE.

7. AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a todos los enfermos voluntarios que han participado desinteresadamente en el presente estudio.

8. CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras, MR y GB, han contribuido en la recogida y análisis de los datos, redacción, y en la elaboración de la versión final del manuscrito. Los autores declaran no tener conflicto de intereses en el presente estudio.

9. REFERENCIAS

1. Locatelli, F.; Pisoni, RL.; Combe C.; Bommer J.; Andreucci, VE.; Piera, L.; Anaemia in haemodialysis patients of five European countries: association with morbidity and mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, (2004).
2. Locatelli, F.; Andrulli, S.; Memoli, B.; Maffei, C.; Del, VL.; Aterini, S.; et al. Nutritional-inflammation status and resistance to erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **21**, 991-998 (2006).
3. KDIGO. Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int. Suppl.* **2**, 279-335 (2012).
4. Macdougall, IC.; Cooper, AC.; Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol. Dial. Transplant.* **17** (Suppl 11), 39-43 (2002).
5. Mann, J.; Kessler, M.; Villa, G.; Martinez-Castelao, A.; Feldt-Rasmussen, B.; Cruz, J.; et al. Darbepoetin alfa once every 2 weeks for treatment of anemia in dialysis patients: a combined analysis of eight multicenter trials. *Clin. Nephrol.* **67**, 140-48 (2007).
6. Vanrenterghem, Y.; Barany, P.; Mann, JF; Kerr, PG; Wilson, J.; Baker, NF.; et al. Randomized trial of darbepoetin alfa for treatment of renal anemia at a reduced dose frequency compared with rHuEPO in dialysis patients. *Kidney Int.* **62**, 2167-75 (2002)
7. Locatelli, F.; Aljama, P.; Barany, P.; Canaud, B.; Carrera, F.; Eckardt, KU.; et al. Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19** Suppl 2, 1-47 (2004).
8. KDOQI Clinical Practice Guideline and Clinical Practice Recommendations for anemia in chronic kidney disease: 2007 update of hemoglobin target. *Am. J. Kidney Dis.* **50**, 471-530 (2007).
9. Pfeffer, MA.; Burdmann, EA.; Chen, CY.; Cooper, ME.; De, ZD.; Eckardt, KU.; et al. A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **19**, 2019-2032 (2009).
10. Szczech, LA.; Barnhart, HX.; Sapp, S.; Felker, GM.; Hernandez, A.; Reddan, D.; et al. A secondary analysis of the CHOIR trial shows that comorbid conditions differentially affect outcomes during anemia treatment. *Kidney Int.* **77**, 239-246 (2010).

11. Drueke, TB.; Locatelli, F.; Clyne, N.; Eckardt, KU.; Macdougall, IC.; Tsakiris, D.; et al. Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N. Engl. J. Med.***16**, 2071-2084 (2006).
12. Rattanasompattikul, M.; Molnar, MZ.; Zaritsky, JJ.; Hatamizadeh, P.; Jing, J.; Norris, KC.; et al. Association of malnutrition-inflammation complex and responsiveness to erythropoiesis-stimulating agents in long-term hemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.***28**,1936-45 (2013).
13. Barany,P.; Inflammation, serum C-reactive protein, and erythropoietin resistance. *Nephrol. Dial. Transplant.***16**, 224-227 (2001).
14. Hodges, VM.; Rainey, S.; Lappin, TR.; Maxwell, AP.; Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.***64**,139-158 (2007).
15. Cooper, AC.; Mikhail, A.; Lethbridge, MW.; Kemeny, DM.; Macdougall, IC.;Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10, and IL-13) by T cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy. *J. Am. Soc. Nephrol.***14**, 1776-1784 (2003).
16. Macdougall, IC.; Cooper, AC.;Hyporesponsiveness to erythropoietic therapy due to chronic inflammation. *Eur. J. Clin. Invest.* **35**, 32-35(2005).
17. Perez, GR.; Gonzalez, PE.; Ceballos, F.; Escallada, CR.; Gomez-Reino, MI., Martin-Rabadan, P.; et al. [Guidelines for quality management of dialysis solutions]. *Nefrologia.* **24** Suppl 2, 1-42 (2004).
18. Rattanasompattikul, M.; Feroze, U.; Molnar, MZ.; Dukkipati, R.; Kovesdy, CP., Nissenson, AR.; et al. Charlson comorbidity score is a strong predictor of mortality in hemodialysis patients. *Int. Urol. Nephrol.***44**, 1813-1823 (2012).
19. Gunnell, J.; Yeun, JY.; Depner, TA.; Kaysen, GA.; Acute-phase response predicts erythropoietin resistance in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **33**, 63-72(1999).
20. Kalantar-Zadeh, K.; Kopple, JD.; Block, G.; Humphreys, MH.; A malnutrition-inflammation score is correlated with morbidity and mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.***38**, 1251-1263(2001).
21. Kalantar-Zadeh, K.; Kopple, JD.; Humphreys, MH.; Block, G.; Comparing outcome predictability of markers of malnutrition-inflammation complex syndrome in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.***19**, 1507-19 (2004).
22. Demir, M.; Kucuk, A., Sezer, MT.; Altuntas, A., Kaya, S.; Malnutrition-inflammation score and endothelial dysfunction in hemodialysis patients. *J. Ren. Nutr.***20**, 377-383 (2010).
23. Rambod, M.; Bross, R.; Zitterkoph, J.; Benner, D.; Pithia, J.; Colman, S.; et al. Association of Malnutrition-Inflammation Score with quality of life and mortality in hemodialysis patients: a 5-year prospective cohort study. *Am. J. Kidney Dis.***53**, 298-309 (2009).
24. Kalantar-Zadeh, K.; Block, G.; McAllister, CJ.; Humphreys, MH.; Kopple, JD.; Appetite and inflammation, nutrition, anemia, and clinical outcome in hemodialysis patients. *Am. J. Clin. Nutr.***80**, 299-307 (2004).
25. Kalantar-Zadeh, K.; McAllister, CJ.; Lehn, RS.; Lee, GH.; Nissenson, AR.; Kopple, JD.; Effect of malnutrition-inflammation complex syndrome on EPO hyporesponsiveness in maintenance hemodialysis patients. *Am. J Kidney Dis.***42**, 761-773 (2003).
26. Kalantar-Zadeh, K., Lee, GH.;Miller, JE.; Streja, E.; Jing, J.; Robertson, JA.; et al. Predictors of hyporesponsiveness to erythropoiesis-stimulating agents in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.***53**, 823-834 (2009).
27. Ho, LC.; Wang, HH.; Peng, YS.; Chiang, CK.; Huang, JW.; Hung, KY.; et al. Clinical utility of malnutrition-inflammation score in maintenance hemodialysis patients: focus on identifying the best cut-off point. *Am. J. Nephrol.* **28**, 840-846 (2008).
28. Alastrue, A.; Valoración de los parámetros antropométricos en nuestra población. *Med. Clin. (Barc).***78**, 407-415 (1982).
29. Chertow, GM.; Lazarus, JM.; Lew, NL.; Ma, L.; Lowrie, EG.; Bioimpedance norms for the hemodialysis population. *Kidney. Int.***52**,1617-1621 (1997).
30. Kilpatrick, RD.; Critchlow, CW.; Fishbane, S.; Besarab, A.; Stehman-Breen, C.; Krishnan, M.; et al. Greater epoetin alfa responsiveness is associated with improved survival in hemodialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.***3**, 1077-1083 (2008).
31. Jelkmann, WE.; Fandrey, J.; Frede, S.; Pagel, H.; Inhibition of erythropoietin production by cytokines. Implications for the anemia involved in inflammatory states. *Ann. NY Acad. Sci.***15**, 300-309 (1994).

32. Goicoechea, M.; Martin, J.; Des, P.; Quiroga, JA.; Ortiz, A.; Carreno, V.; et al. Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodialysis patients. *Kidney Int.***54**, 1337-1343 (1998).
33. Panichi, V.; Rosati, A.; Bigazzi, R.; Paoletti, S.; Mantuano, E.; Beati, S.; et al. Anaemia and resistance to erythropoiesis-stimulating agents as prognostic factors in haemodialysis patients: results from the RISCAVID study. *Nephrol. Dial. Transplant.***26**, 2641-2648 (2011).
34. Barany, P.; Vito-Filho, J.C.; Bergstrom, J.; High C-reactive protein is a strong predictor of resistance to erythropoietin in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.***29**, 565-568 (1997).
35. Gracia-Iguacel, C.; Gonzalez-Parra, E.; Perez-Gomez, MV.; Mahillo, I.; Egido, J.; Ortiz, A.; et al. Prevalence of protein-energy wasting syndrome and its association with mortality in haemodialysis patients in a centre in Spain. *Nefrologia.* **33**, 495-505 (2013).
36. Akgul, A.; Bilgic, A.; Sezer, S.; Ozdemir, FN.; Olcay, I.; Arat, Z.; et al. Effect of protein-energy malnutrition on erythropoietin requirement in maintenance hemodialysis patients. *Hemodial. Int.***11**, 198-203 (2007).
37. Cuesta, GC.; Poveda-Andres, JL.; Garcia, PJ.; Roma, SE.; Cost minimisation analysis for darbepoetin alpha vs. epoetin alpha in chronic kidney disease patients on haemodialysis. *Farm. Hosp.* **34**, 68-75 (2010).
38. Sitter, T.; Bergner, A.; Schiff, H. Dialysate related cytokine induction and response to recombinant human erythropoietin in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.***15**, 1207-1211 (2000).
39. Panichi, V.; Rosati, A.; Paoletti, S.; Ferrandello, P.; Migliori, M.; Beati, S.; et al. A vitamin E-coated polysulfone membrane reduces serum levels of inflammatory markers and resistance to erythropoietin-stimulating agents in hemodialysis patients: results of a randomized cross-over multicenter trial. *Blood. Purif.***32**, 7-14 (2011).

Cannabinoides: una prometedora herramienta para el desarrollo de nuevas terapias

Ana Isabel Fraguas-Sánchez¹, Ana María Fernández-Carballido^{1,2}, Ana Isabel Torres-Suárez^{1,2,*}

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. ²Instituto Universitario de Farmacia Industrial. Universidad Complutense de Madrid.
e-mail: galaaaa@ucm.es

Recibido el 15 de junio de 2014

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 3 (2014), pag.555-577

RESUMEN

Los cannabinoides, mediadores lipídicos presentes en la planta *Cannabis sativa*, han sido utilizados en medicina desde la antigüedad; retirándose del arsenal terapéutico en la primera mitad del siglo XX debido a sus efectos adversos psicoactivos y a la aparición de alternativas más seguras. No obstante el descubrimiento del sistema cannabinoide endógeno y su participación reguladora en múltiples funciones fisiológicas básicas del organismo suscitaron de nuevo a finales del siglo pasado el interés de los investigadores como posibles herramientas terapéuticas en diversas patologías como trastornos neurodegenerativos y metabólicos, enfermedades autoinmunes, glaucoma e, incluso, cáncer.

Palabras clave: dolor; cáncer; enfermedades neurodegenerativas.

ABSTRACT

Cannabinoids: a promising tool for the development of novel therapies

Cannabinoids, lipid mediators presents in *Cannabis sativa* plant, have been used for medicinal purposes for centuries. In the first half of the twentieth century they were removed from medicine due to their psychoactive adverse effects and the emergence of safer drugs. Nevertheless at the end of this century the discovery of endogenous cannabinoid system and its participation in multiple basic physiological functions have attracted much attention to the researchers as possible tools in the treatment of several pathological conditions such as neurodegenerative and metabolic disorders, autoimmune diseases, glaucoma and cancer.

Keywords: pain; cancer; neurodegenerative diseases.

1. INTRODUCCIÓN

El término Cannabinoides fue inicialmente usado para hacer referencia a un grupo de compuestos presentes en la resina secretada por los brotes y las partes florecidas de la planta *Cannabis sativa*, resina conocida por sus propiedades psicoactivas, al producir psicosis, ansiedad, depresión y alucinaciones. Los cannabinoides más relevantes son el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) (el más abundante y responsable de los efectos psicoactivos de esta planta) y el Cannabidiol (CBD), el segundo en abundancia (1). La elevada liposolubilidad de estos compuestos llevó a pensar que ejercían su efecto mediante la modificación de los fosfolípidos de las membranas plasmáticas. Esta teoría se mantuvo durante décadas hasta que en 1990 se aisló y caracterizó el primer receptor específico de cannabinoides (1,2), que demostraba que el efecto de estos compuestos era mediado por receptores de membrana. Este descubrimiento llevó además a la búsqueda de ligandos endógenos que los activaran, los llamados endocannabinoides, de los que la Anandamida (AEA) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG) son los más importantes (3,4). De esta manera, en la actualidad el término cannabinoide no sólo designa a esos componentes naturales aislados de la planta *Cannabis sativa* (denominados fitocannabinoides), sino también a esos ligandos endógenos que actúan sobre receptores específicos de cannabinoides (endocannabinoides), y a los análogos sintéticos de ambos grupos.

Desde el punto de vista terapéutico, el cannabis ha sido empleado en medicina desde la antigüedad, siendo retirado del arsenal terapéutico a mediados del siglo XX debido a sus efectos psicoactivos. Hoy en día sin embargo vuelve a tomar interés el empleo de determinados cannabinoides en diversas patologías tales como cáncer y esclerosis múltiple, existiendo incluso algunas formulaciones comercializadas constituidas por estos compuestos.

2. CANNABIS SATIVA

Cannabis sativa (Figura 1) es una planta herbácea anual, dioica perteneciente a la familia de las Cannabaceae; originaria de la zona este y central de Asia (5). A los preparados psicótrópos obtenidos de esta planta se les conoce como marihuana o hachís, dependiendo de las partes de la planta y los procesos utilizados para su preparación. El término marihuana hace referencia a las flores desecadas y tallos de la planta que habitualmente se fuman; mientras que hachís describe a la resina concentrada que se obtiene a partir de las flores y que se puede ingerir (1).

Es una planta que ha sido utilizada por el hombre desde la antigüedad con una amplia variedad de objetivos, que van desde aplicaciones textiles o alimentarias hasta su uso con fines recreativos, religiosos o terapéuticos, siendo

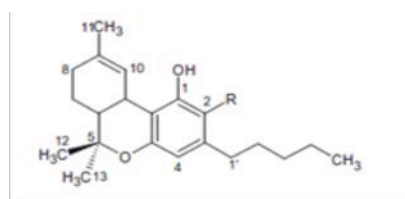
estos últimos uno de los fines más relevantes (6,7). En la medicina tradicional China preparados de esta planta eran empleados para el tratamiento de la malaria, beri-beri y estreñimiento, describiéndose también sus posibles efectos psicoactivos, denominados como “visiones diabólicas” (8). Los hindúes la empleaban así mismo en terapéutica para el tratamiento de neuralgias, convulsiones infantiles, calambres y para algunas cefaleas como las migrañas. No fue hasta el siglo XIX cuando empezó a utilizarse en la medicina occidental (6). En Inglaterra y en Estados Unidos se utilizaban extractos de resina de cannabis disuelta en etanol (la denominada tintura de cannabis) para el tratamiento del tétanos, rabia, cólera, convulsiones infantiles, reumatismo o deliriums tremens (6,7). Sin embargo, en la primera mitad del siglo XX el empleo medicinal del cannabis desapareció, debido sobre todo a la variabilidad en la potencia de los extractos, a la impredecible respuesta individual que presentaba y a la aparición en terapéutica de alternativas más seguras y sin los efectos adversos psicoactivos que presenta el cannabis (9).



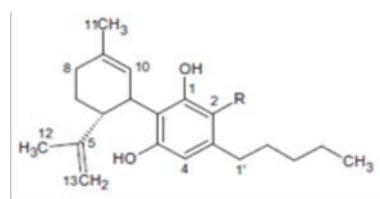
Figura 1.- Cannabis sativa

Desde principios del siglo XX hubo numerosos intentos de aislar y elucidar estructuralmente los compuestos activos de esta planta. En 1930 se aisló el primer cannabinoide, el CBD, pero su estructura no fue elucidada hasta 1963. En cuanto al THC no fue aislado y elucidado hasta 1964 (6,9). Actualmente se han aislado más de 100 cannabinoides (5,10) destacando además de los citados anteriormente el Cannabicromeno (CBC), Canabigerol (CBG), Cannabinol (CBN), Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), Ácido cannabicromenico (CBCA), Ácido

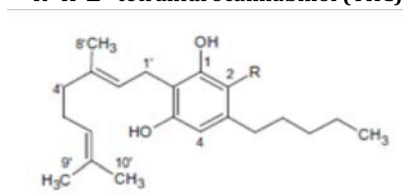
cannabigerólico (CBGA), Ácido cannabínolico (CBDA), y Ácido Δ^9 -tetrahidrocannabinólico (THCA) entre otros (11) (Figura 2).



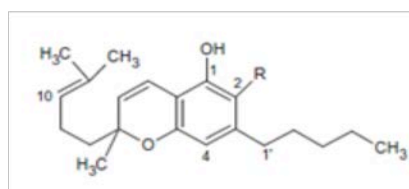
R=COOH Ácido Δ^9 -tetrahidrocannabinólico (THCA)
R=H Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC)



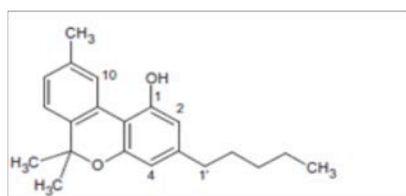
R=COOH Ácido cannabidiólico (CBDA)
R=H Cannabidiol (CBD)



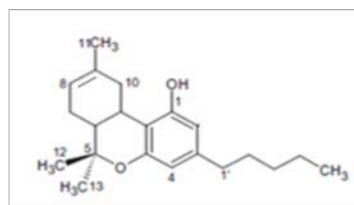
R=COOH Ácido cannabigerólico (CBGA)
R=H Cannabigerol (CBG)



R=COOH Ácido cannabícroménico (CBCA)
R=H Cannabícromeno (CBC)



Cannabinol (CBN)



Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC)

Figura 2.- Estructura de los diferentes cannabinoides naturales presentes en *Cannabis sativa*.

3. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Debido a la elevada liposolubilidad que presentan los cannabinoides, se pensaba que ejercían su acción modificando la estructura fosfolipídica de las membranas plasmáticas celulares. Sin embargo el descubrimiento de receptores específicos para estos compuestos desmontó esta teoría y puso de manifiesto que ejercían su acción uniéndose a receptores de membrana (12). Esto llevó a la búsqueda de ligandos endógenos que actuaran sobre dichos receptores: son los llamados endocannabinoides, que junto con sus receptores específicos constituyen el Sistema Cannabinoide Endógeno (SCE).

3.1. Biosíntesis y degradación de endocannabinoides

Los endocannabinoides son moléculas derivadas de ácidos grasos poliinsaturados, sintetizadas a demanda, entre los cuales podemos citar a la etanolamida del ácido araquidónico, conocida como Anandamida (AEA), el 2-

araquidonil glicerol (2-AG), 2-araquidonil glicerol éter (noladin éter), O-araquidonil etanolamida (Virodhamina) y el N-araquidonil dopamina (NADA); siendo los dos primeros los más importantes (3,4) (Figura 3).

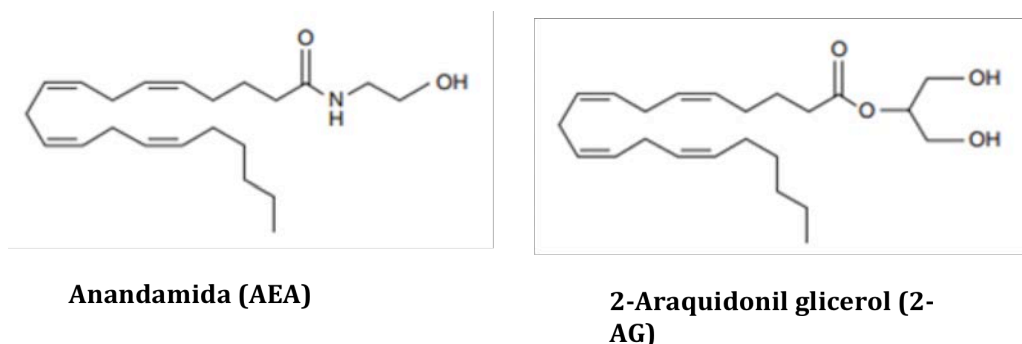


Figura 3.- Estructura de los principales endocannabinoides: AEA y 2-AG.

La AEA se sintetiza a partir de la fosfatidil-etanolamina (PEA), que gracias a la acción de la N-acetiltransferasa (NAT) da lugar a la N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) por la transferencia de ácido araquidónico desde la fosfatidilcolina. A continuación NAPE es hidrolizada por la fosfolipasa D, dando lugar a la AEA (4,12-18). El 2-AG, por el contrario, se sintetiza a partir de fosfatidil inositol (PI) por acción de la fosfolipasa C (PLC) que da lugar al diacilglicerol (DAG), que será hidrolizado por la diacilglicerollipasa (DAGL) para sintetizar el 2-AG (4, 12-17) (Figura 4).

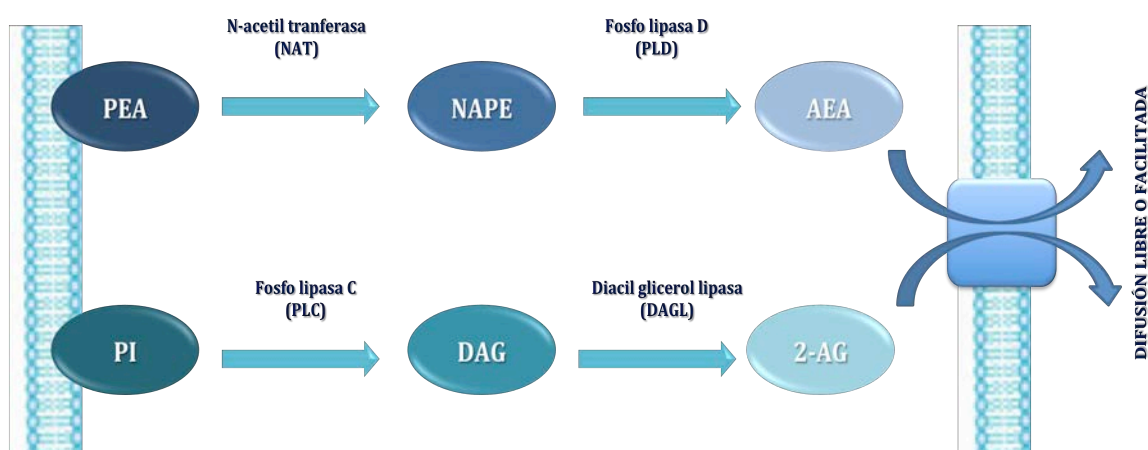


Figura 4.- Esquema de la síntesis y liberación de los endocannabinoides AEA y 2-AG. La fosfatidil-etanolamina (PEA) por la acción de la N-acetiltransferasa (NAT) da lugar a la N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE), que es hidrolizada por la fosfolipasa D, dando lugar a la AEA. El 2-AG se sintetiza a partir de fosfatidil inositol (PI), que por acción de la fosfolipasa C (PLC) da lugar al diacilglicerol (DAG), que será hidrolizado por la diacilglicerollipasa (DAGL) dando lugar a 2-AG.

Además de estas rutas sintéticas ambos endocannabinoides poseen vías de síntesis alternativas. La AEA puede ser sintetizada a partir de ácido araquidónico y etanolamina, por la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) cuando ambos sustratos se encuentran en elevadas concentraciones. El 2-AG se sintetiza también a partir de PI, que por acción de la fosfolipasa A (PLA) da lugar a liso-fosfolípidos, y estos al 2-AG al ser hidrolizados por la Lyso-fosfolipasa C (Lyso-PLC) (17) (Figura5).

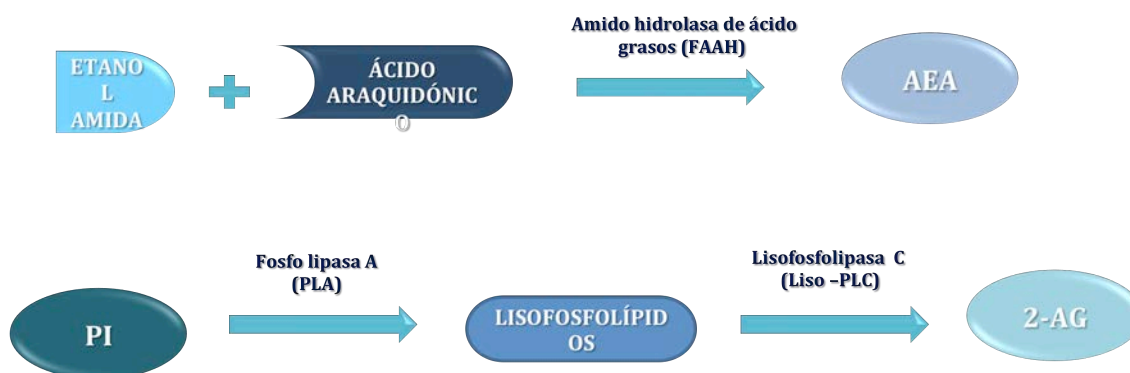


Figura 5.- Esquema de las rutas de síntesis alternativas de los endocannabinoides AEA y 2-AG. La AEA también puede ser sintetizada a partir de ácido araquidónico y etanolamina por la misma enzima responsable de su degradación, la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) cuando ambos sustratos se encuentran en elevadas concentraciones. El 2-AG se sintetiza también a partir de fosfatidilinositol (PI), que por acción de la fosfolipasa A (PLA) da lugar a liso-fosfolípidos, y estos al 2-AG al ser hidrolizados por la Lyso-fosfolipasa C (Lyso-PLC).

En cuanto a las rutas degradativas, cabe decir que la AEA presenta una vida media muy corta, pues es recaptada de la hendidura sináptica por un transportador de alta afinidad y degradada en el interior de la célula por la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) dando lugar a sus dos componentes, etanolamina y ácido araquidónico. El 2-AG una vez liberado puede ser recaptado por el transportador de anandamida y degradado posteriormente por la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL) (4, 15-17) (Figura 6).

3.2. Receptores específicos de cannabinoides

Hasta el momento hay dos tipos de receptores de Cannabinoides identificados: CB₁ y CB₂. Pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y presentan siete dominios transmembrana (19,20) (Figura 7).

El receptor CB₁ fue caracterizado en 1990 (2,19, 20). Se trata de una proteína de 473 aminoácidos (20) insertada en la membrana plasmática a la que se une tanto el THC como los endocannabinoides. Se localiza fundamentalmente a nivel del sistema nervioso central (19-24), encontrándose la mayor densidad de los mismos en los ganglios basales (sustancia nigra, globo pálido, núcleo entopeduncular y caudado putamen lateral). La densidad es moderada en las capas

número I y IV de la corteza cerebral, y aún menor en el hipotálamo, médula espinal y tallo cerebral (20) (Figura 7). Además de a nivel central estos receptores los encontramos también en regiones periféricas tales como próstata, amígdalas, ovarios, útero y a nivel presináptico en terminaciones nerviosas simpáticas (22,23). Hay que destacar que esta distribución explica muchos de los efectos producidos por los cannabinoides. Por ejemplo su presencia en el hipocampo y la corteza explican las alteraciones cognitivas que producen, o la elevada densidad que encontramos en los ganglios basales determina las alteraciones del movimiento y en el control postural. Hay que señalar, además, que la baja densidad de estos receptores a nivel del tallo cerebral (región que controla la función respiratoria) explica la ausencia de toxicidad a este nivel de los cannabinoides (20).

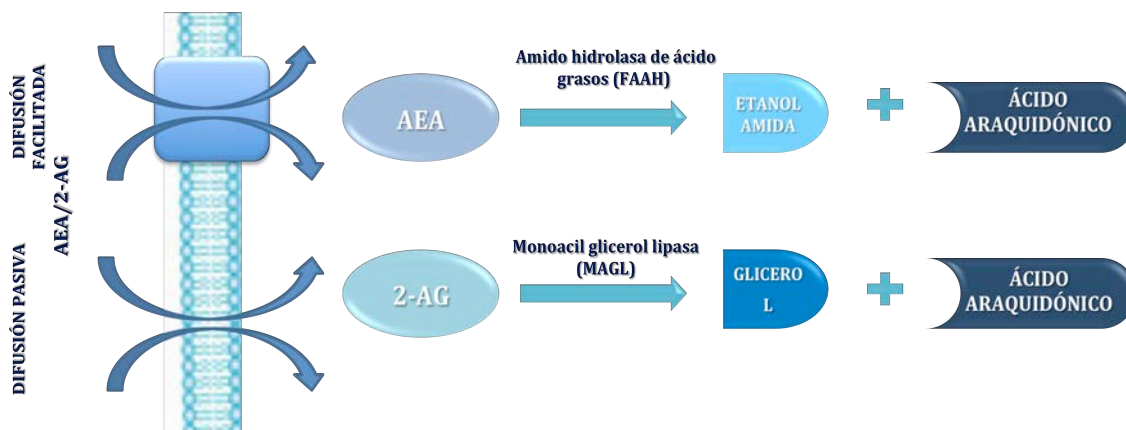


Figura 6.- Esquema de las rutas de degradación de los endocannabinoides AEA y 2-AG. La AEA es degradada por la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) dando lugar a etanolamida y ácido araquidónico. El 2-AG es degradado por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) dando lugar a glicerol y ácido araquidónico.

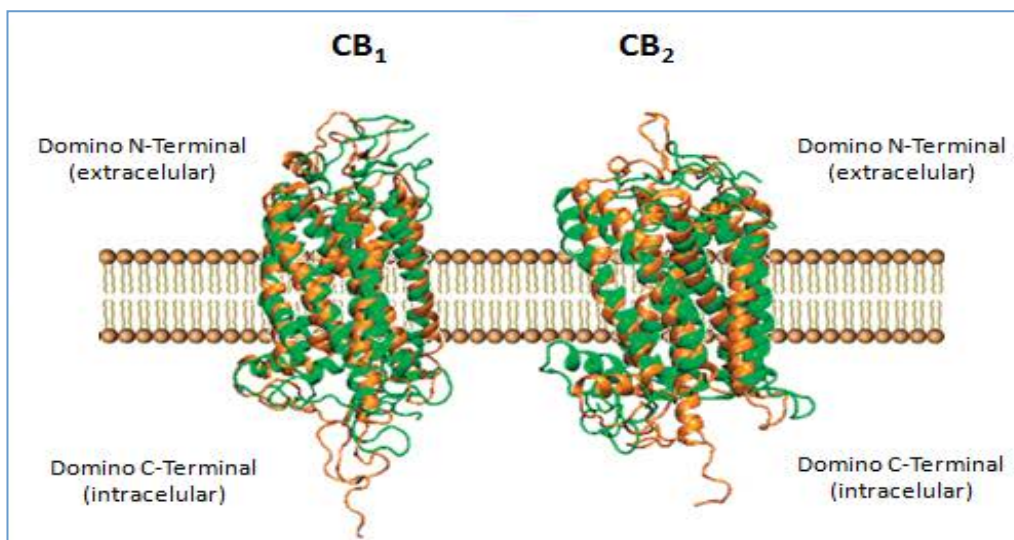


Figura 7.- Estructura de los receptores CB₁ y CB₂.

El receptor CB₂, aislado en 1993 (2) de bazo de rata y de una línea leucémica humana (HL60) (20,25), es un polipéptido de 360 aminoácidos (25) que presenta una distribución mucho más limitada, encontrándose casi en exclusividad en el sistema inmune (19-25), tanto a nivel de tejidos (bazo, timo y nódulos linfáticos) como de células (linfocitos T y B, monocitos, macrófagos, y neutrófilos). Son por tanto estos receptores los responsables de la acción inmunosupresora de la marihuana.

La activación de estos receptores específicos de cannabinoides implica la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y por tanto una disminución de los niveles de AMPc (19-24). Como consecuencia de la activación de receptores CB₁ (Figura 8) se produce la modificación de diversas proteínas celulares como factores de transcripción génica y canales iónicos. Sobre canales de potasio (K⁺) y de calcio (Ca²⁺) aumenta la conductancia y disminuye la entrada de estos iones respectivamente. Esto origina una disminución en la despolarización de la membrana bloqueando a nivel de las terminaciones presinápticas la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, noradrenalina y glutamato (26). Se produce también la activación de las MAP quinasas (MAPK), alterándose por tanto diversos procesos de proliferación y diferenciación celular (21-23). La activación de los receptores CB₂ sigue las mismas rutas que la de los CB₁ pero sin verse afectados los canales iónicos y por tanto la liberación de neurotransmisores (21).

Las principales características y diferencias de los receptores CB₁ y CB₂ están recogidas en la Tabla 1.

3.3. Otros receptores de cannabinoides

Además de activar los receptores CB₁ y CB₂, los cannabinoides van actuar sobre otros receptores de membrana entre los que podemos destacar el receptor huérfano GPR55, el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) y los receptores proliferadores de peroxisomas (PPAR) α y γ (2).

- **Receptor huérfano GPR 55:** El receptor GPR55, aislado y clonado por primera vez en 1999, es una proteína de 319 aminoácidos perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G (27). Es todavía conocido como uno de los receptores huérfanos, a pesar de que estudios recientes postulan al lisofosfatidilinositol (LPI) como su ligando endógeno (28).

El GPR55 se localiza tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos, principalmente en las glándulas adrenales, bazo, hígado, tracto gastrointestinal, y a nivel óseo y vascular; y está implicado en numerosas funciones fisiológicas, entre las que podemos destacar el control del dolor (29). Se encuentra además expresado por diversas células cancerígenas, participando en procesos de angiogénesis y proliferación e invasión tumoral (27).

A pesar de mostrar estructuralmente una baja homología con los receptores CB₁ y CB₂ (CB₁, 13,5% and CB₂, 14,4%), (30) diversos cannabinoides como el THC y el CBD son capaces de unirse a este receptor. Mientras que el THC, y algunos de sus análogos sintéticos como el CP55940, activan estos receptores, el cannabidiol se comporta como antagonista de los mismos (31).

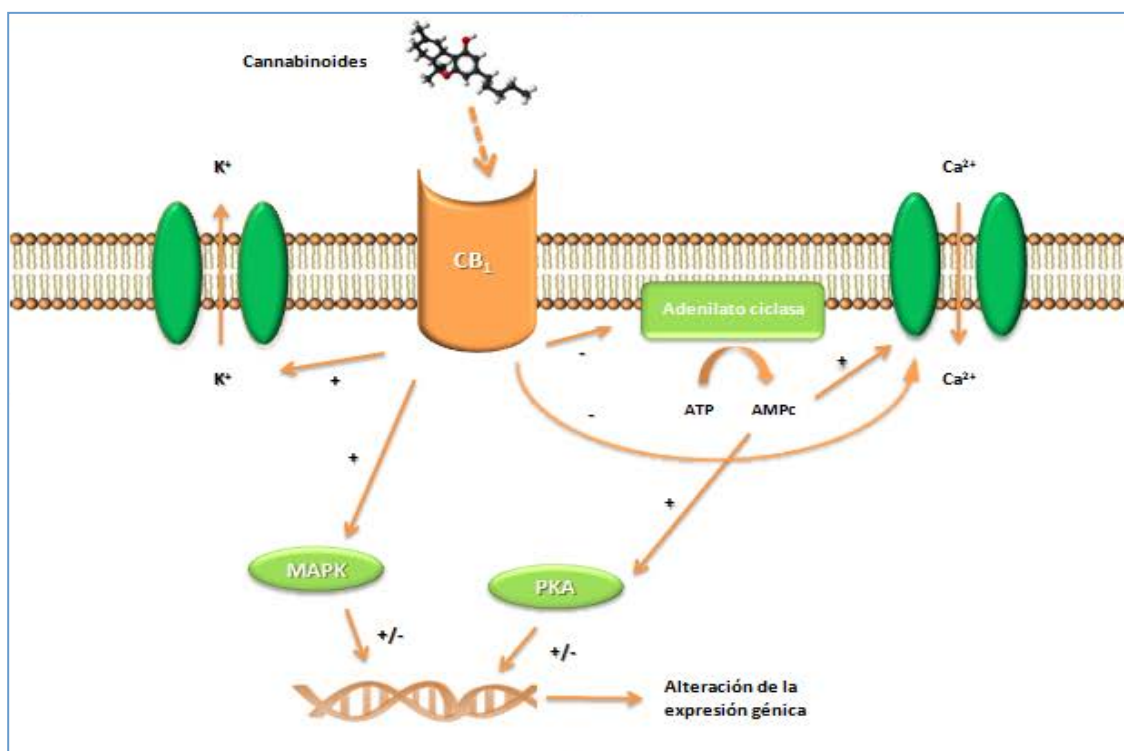


Figura 8.- Activación de receptores CB₁. Rutas de señalización. La activación de receptores CB₁ implica la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y por tanto una disminución de los niveles de AMPc, y la activación de canales iónicos de potasio y la inhibición de canales de calcio, aumentando la conductancia y disminuyendo la entrada de estos iones respectivamente. Se produce también la activación de las MAP quinasas (MAPK) y una disminución de la protein quinasa, alterándose por tanto diversos procesos de proliferación y diferenciación celular.

- **Receptor de potencial transitorio V₁:** El receptor de potencial transitorio V₁ o TRPV₁ es una proteína de 6 dominios transmembrana, miembro de la superfamilia de canales iónicos de receptores de potencial transitorio, localizado a nivel del sistema nervioso e implicado en el control y la percepción del dolor (32).

Este receptor puede ser activado por diversos estímulos como son temperaturas superiores a 43 °C, moléculas como la capsaicina y mediadores lipídicos entre los que se encuentran algunos cannabinoides (32), como el cannabidiol y el cannabigerol (29).

- **Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas:** Los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPRA) son una familia de receptores nucleares que presenta tres isoformas: α, δ y γ. Juegan un papel

esencial en múltiples funciones fisiológicas como la regulación del metabolismo lipídico, la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad a la insulina y la inflamación (33,34). Los ligandos de estos receptores son moléculas lipídicas entre las que se encuentran algunos cannabinoides, entre los que podemos destacar endocannabinoides como la AEA, el 2-AG y la oleoanandamida; y fitocannabinoides como el THC (34) y el CBD (29).

Tabla 1.- Principales características y diferencias de los receptores específicos de cannabinoides CB₁ y CB₂.

RECEPTORES ESPECÍFICOS DE CANNABINOIDES		
	CB ₁	CB ₂
Distribución	Sistema nervioso central	Sistema inmune
	Terminaciones nerviosas periféricas	
	Testículos, Ovarios, Útero	
Mecanismo intracelular	Inhibición de la adenilato ciclasa	Inhibición de la adenilato ciclasa
	Inhibición canales de calcio	Activación de MAP kinasas
	Estimulación canales de potasio	
	Activación de MAP kinasas	
Agonistas endógenos	Anandamida	2-Araquidonil glicerol
	2-araquidonil-glicerol	
Agonistas exógenos	Δ ⁹ -Tetrahidrocannabinol	
	CP 55940	
	WIN55212-2	
	Nabilona	
Antagonistas	Rimonabant	SR144528

3.4. Acciones fisiológicas del sistema endocannabinoide

El sistema cannabinoide endógeno juega un papel modulador en diferentes procesos fisiológicos, principalmente a nivel del sistema nervioso, pero también actúa sobre el metabolismo energético, el sistema inmune, y el sistema endocrino.

A nivel nervioso una de las acciones más estudiadas y establecidas de los cannabinoides es la atenuación de la neurotransmisión (35). La activación de los receptores CB₁ produce una inhibición de la liberación de neurotransmisores

excitatorios e inhibitorios como GABA, Glutámico, Serotonina, Noradrenalina, Dopamina y Acetilcolina. Este sería precisamente el mecanismo por el cual el sistema endocannabinoide regularía la plasticidad neuronal, produciendo efectos fisiológicos a nivel de memoria, aprendizaje (36), funciones motoras, respuesta al dolor y control del apetito (37).

Por otro lado el efecto general que ejercen los cannabinoides sobre el sistema endocrino es de tipo inhibitorio. Actúan sobre el sistema hipotálamo-hipófiso-gonadal, produciendo una disminución de la secreción de hormona luteinizante (LH) y de hormona folículoestimulante (FSH) (38,39), en la que participan los receptores CB₁ que se expresan en la hipófisis anterior (38). Como consecuencia se produce también una disminución de la secreción de las hormonas sexuales y de la prolactina. Se ejerce así mismo una regulación inhibitoria del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, de manera que en estado basal existe un tono endocannabinoide que inhibe tanto la secreción de hormona adenocorticotropa (ACTH), como de glucocorticoides (40). Además se produce una disminución de las hormonas tiroideas y de la hormona de crecimiento (38).

En cuanto al metabolismo energético, hay que destacar el papel orexigénico que presentan los cannabinoides. El papel que tiene el sistema endocannabinoide en la regulación del apetito y del metabolismo energético se debe en gran parte a su acción sobre la quinasa activada por adenosina 5'-monofosfato (AMPK). La AMPK actúa como sensor del estado energético celular y es activada por cualquier estímulo que reduzca los niveles de ATP aumentando los de AMP. Su activación pone en marcha reacciones catabólicas mientras que inhibe vías anabólicas. Los cannabinoides estimulan AMPK en el hipotálamo, induciendo un aumento del apetito, mientras que inhiben la AMPK del hígado y tejido adiposo produciendo efectos lipogénicos y diabetogénicos (41,42).

La activación de receptores CB₂ también conduce a un efecto inmunomodulador, estimulándose la proliferación de linfocitos B, linfocitos T y la liberación de citocinas (43,44).

4. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES

En cuanto a los ligandos de los receptores específicos de cannabinoides, hay que destacar que tanto sobre los receptores CB₁ como sobre CB₂ van a actuar además de los endocannabinoides, los fitocannabinoides y los análogos sintéticos de ambos grupos.

4.1. Agonistas.

Existe una amplia variedad de ligandos que se comportan como agonistas de los receptores cannabinoides y por tanto como activadores de las respuestas mediadas por éstos. Desde el punto de vista farmacológico estos ligandos se

clasifican en tres grupos: agonistas no selectivos, agonistas selectivos CB₁ y agonistas selectivos CB₂.

Tabla 2.- Agonistas y antagonistas principales de los receptores CB₁ y CB₂.

AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES CB ₁ Y CB ₂			
	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	
1. Agonistas no selectivos	Cannabinoides clásicos	THC Δ^8 -THC, CBN, CBD	<u>Antagonista selectivos CB₁</u> Rimonabant
		HU-210, HU-243, O-1057	
	Cannabinoides no clásicos	CP55, 940; Levonantradol;	
		Desacetilevonantradol	
Aminoalquilindoles	WIN55, 212-2		
Eicosanoides	AEA , 2-AG		
2. Agonistas selectivos CB ₁	ACEA ,ACPA, Metanandamida , Noladin éter	<u>Antagonista selectivos CB₂</u> SR144528	
3. Agonistas selectivos CB ₂	JWH-133, HU-308, JWH-015 y AM1241		

- **Agonistas no selectivos:** Los agonistas no selectivos se dividen a su vez en cuatro grupos con estructura química bien diferenciada: cannabinoides clásicos, cannabinoides no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides.

El grupo de cannabinoides clásicos se corresponde con compuestos con estructura de dibenzopirano, e incluye los cannabinoides naturales presentes en *Cannabis sativa* como el THC, Δ^8 -THC, CBN, y CBD; y sus análogos sintéticos. Entre estos últimos cabe destacar los análogos del THC, como el 11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilheptilo (HU-210), el 11-hidroxi-hexahidrocannabinoldimetilheptilo (HU-243) y el 3-(5'ciano-l',1'-dimetilpentil)-l-(4-N-morfolinobutiliroxi)- Δ^8 -THC (O-1057) que presenta carácter hidrosoluble (45). Dentro de este grupo se encuentra también el propio THC sintético (Dronabinol).

Los cannabinoides no clásicos son análogos bicíclicos y tricíclicos del THC que carecen del anillo pirano, entre los que destacan el CP55, 940 (principal representante de este grupo); el CP55,244; CP50,556 (levonantradol) y el desacetilevonantradol.

El tercer grupo de compuestos cannabimiméticos no selectivos son los aminoalquilindoles, cuyo principal representante es el WIN55, 212-2.

Por último el grupo de los eicosanoides surgió con el descubrimiento de la existencia de ligandos cannabinoides endógenos (45), e incluye una serie de compuestos derivados estructuralmente del ácido araquidónico siendo los más importantes la AEA y el 2-AG.

- **Agonistas CB1 selectivos:** La araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA) y la araquidonilciclopropilamida (ACPA) son agonistas altamente selectivos de los receptores CB₁ (45). Los derivados estructurales de la anandamida como la metanandamida y el endocannabinoide noladin éter, se incluyen también dentro de este grupo.

- **Agonistas CB2 selectivos:** Se trata de análogos sintéticos de los cannabinoides no selectivos clásicos y no clásicos. Así pues encontramos en este grupo JWH-133, HU-308, JWH-015 y AM1241 (45,46). Estos compuestos carecen de los efectos psicoactivos característicos de muchos cannabinoides, representando por tanto una buena oportunidad para ser utilizados en terapéutica (47).

4.2. Antagonistas

En los últimos años se han desarrollado diversas moléculas capaces de antagonizar, de forma selectiva, los efectos cannabimiméticos mediados por los receptores CB₁ o CB₂, y que han supuesto una herramienta fundamental para la caracterización farmacológica de estas proteínas. Una de las moléculas más potente y más ampliamente utilizada como antagonista de los receptores de cannabinoides CB₁ es el rimonabant, que presenta una marcada selectividad por los receptores CB₁ y revierte por tanto las acciones de los agonistas cannabinoides que actúan a través de estos receptores. En cuanto a antagonistas CB₂ selectivos encontramos un análogo del rimonabant, el SR144528.

5. POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS CANNABINOIDES.

La implicación del sistema cannabinoide endógeno en múltiples funciones fisiológicas básicas del organismo convierte a los cannabinoides en prometedores candidatos para el tratamiento de numerosas patologías (Figura 9), destacando las enfermedades neurodegenerativas, trastornos metabólicos, diabetes y cáncer (48).

Hay que destacar que mientras que el potencial terapéutico que presentan estos compuestos en enfermedades como esclerosis múltiple, dolor, emesis, cáncer o su aplicación como estimulantes del apetito está ampliamente reconocido, existiendo incluso formulaciones a base de cannabinoides comercializadas con estas indicaciones; su aplicación terapéutica en otras enfermedades como diabetes,

glaucoma, Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos presenta más controversia.

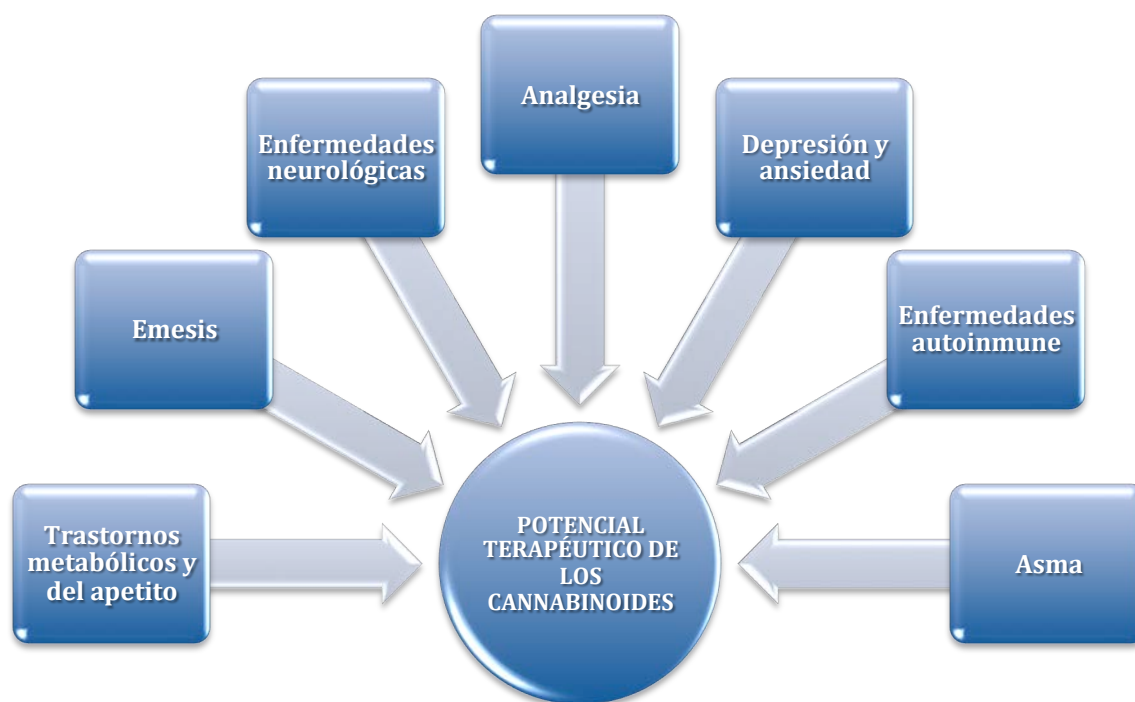


Figura 9.- Potenciales usos terapéuticos de los cannabinoides.

5.1. Estimulación del apetito y tratamiento de la obesidad

El cannabis es conocido por ser un potente estimulante del apetito (1,29,49,50), incrementando principalmente la ingesta de alimentos ricos en grasa. Este fenómeno está regulado por el SCE y se debe a la activación de receptores CB₁ a nivel hipotalámico. Además de la estimulación del apetito, la activación de estos receptores en el tracto digestivo, sobre todo a nivel hepático, aumenta la lipogénesis, y por tanto la síntesis en novo de ácidos grasos y la ganancia de peso. De esta manera agonistas CB₁ como el THC o sus análogos tienen aplicación en situaciones que requieren una ganancia de peso como el síndrome de desgaste asociado a SIDA o a cáncer, existiendo formulaciones a base de cannabinoides comercializadas para este fin.

Por el contrario, antagonistas CB₁ como el rimonabant disminuyen el apetito, y tienen utilidad en el tratamiento de la obesidad (50). Este compuesto fue aprobado y comercializado con este fin, pero se retiró debido a los graves efectos secundarios de carácter psiquiátrico que ocasionaba.

5.2. Emesis.

Los cannabinoides presentan un importante efecto antiemético siendo capaces de prevenir las náuseas y vómitos asociados a muchos fármacos (1,2,11,29,43). El mecanismo por el que ejercen este efecto no está del todo esclarecido. La activación de receptores CB₁ en el tracto solitario parece ser la responsable, aunque los receptores TRPV₁ también estarían implicados (2), lo que explicaría por qué cannabinoides que no actúan sobre los receptores CB₁, como el CBD, presentan propiedades antieméticas (29). El THC y su análogo sintético Nabilona presentan acción antiemética (1), estando aprobado su uso en la prevención de las náuseas y vómitos inducidos por agentes quimioterápicos.

5.3. Enfermedades neurológicas

El poder antioxidante y neuroprotector que presentan numerosos cannabinoides los convierte en potenciales candidatos terapéuticos de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (51) tales como Alzheimer, Parkinson, Esclerosis múltiple o epilepsia.

- **Esclerosis múltiple:** la esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central, de origen autoinmune, que se manifiesta con rigidez muscular, espasticidad, temblor, fatiga y dolor (52). Los cannabinoides presentan una importante aplicación en el tratamiento de esta enfermedad al ser capaces de mejorar el dolor neuropático y la espasticidad que la caracteriza (52-54). El mecanismo por el que se ejercen estos efectos parece implicar a los receptores específicos de cannabinoides, sobre todo a los receptores CB₁ (52), pues agonistas de estos receptores han demostrado reducir la rigidez de las extremidades y mejorar la función motora, mientras que antagonistas de los mismos evitan estos efectos. Entre los cannabinoides que presentan estas propiedades hay que destacar al THC, que de hecho está aprobado y comercializado en combinación con el CBD con este fin.

Estudios recientes han demostrado, además, que la aplicación de los cannabinoides en esta enfermedad va más allá que un mero control de la sintomatología, pues debido a sus propiedades neuroprotectoras son capaces de frenar la degeneración neuronal que se produce y por tanto la progresión de la enfermedad. (53,54).

- **Epilepsia:** debido a sus propiedades anticonvulsivantes muchos cannabinoides, como el CBD, pueden presentar utilidad en el tratamiento de la epilepsia (29). El mecanismo por el cual estos cannabinoides ejercen acción anticonvulsivante es la reducción de las concentraciones plasmáticas de calcio (29,55) y el antagonismo CB₁ (29).

- **Alzheimer:** el Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por depósitos de β -amiloide y deficiencia de acetilcolina, en la que se produce pérdida neuronal y deficiencia cognitiva (56). Aunque el potencial de los

cannabinoides en esta patología no está del todo esclarecido, algunos cannabinoides como el THC parecen presentar utilidad en esta enfermedad al aumentar la disponibilidad de acetilcolina y reducir la acumulación de β -amiloide (56-58).

- **Parkinson:** el Parkinson es una patología neurodegenerativa en la que se produce una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. El potencial terapéutico de los cannabinoides en esta enfermedad presenta más controversia. Mientras hay estudios que indican que son capaces de mejorar los síntomas parkinsonianos al incrementar la transmisión dopaminérgica, otros indican que carecen de efecto. Lo que sí está más esclarecido es su capacidad para revertir la discinesia producida por Levodopa (1,50).

5.4. Cáncer

Los cannabinoides se están empleando satisfactoriamente en el tratamiento de los efectos adversos asociados al cáncer y los tratamientos antitumorales tales como náuseas, vómitos, falta de apetito, pérdida de peso y dolor. El dronabinol (THC sintético) y la nabilona están comercializados para combatir y prevenir las náuseas y vómitos asociados a quimioterapia y radioterapia (59,60). Pero, con independencia de este uso paliativo en la terapia anticancerosa, algunos cannabinoides como el THC, CBD, CBG, CBC, CBDA y Δ^8 -THC, han demostrado tener un efecto antitumoral per-se (29), al inhibir el crecimiento descontrolado de las células tumorales (por inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación celular) e impedir la angiogénesis y metástasis tumoral disminuyendo e inhibiendo la adhesión e invasión de las células tumorales. Estos efectos se han observado en muchos tipos de cáncer como pulmón, mama, próstata, colón, hígado, piel, glioblastomas, leucemias y linfomas (29,59,61). En cuanto a los mecanismos responsables de la acción antitumoral no están del todo esclarecidos, aunque parecen implicados tanto receptores específicos para cannabinoides (CB_1 y CB_2) como receptores independientes como el receptor $TPRV_1$ (29,22).

Por otro lado, en algunos estudios realizados con THC se ha observado un efecto bifásico sobre las células tumorales, de manera que a baja concentración incrementa la proliferación tumoral y a concentraciones más elevadas la inhibe. Este efecto positivo sobre la proliferación celular parece deberse a la activación de receptores CB_2 que disminuiría la respuesta inmunitaria frente al tumor favoreciendo su crecimiento (59).

Por lo tanto, aunque por ahora los resultados son prometedores, son todavía muchos los estudios necesarios para definir con claridad el uso de los cannabinoides en el tratamiento del cáncer.

5.5. Analgesia

Los cannabinoides son capaces de disminuir la reactividad al dolor y presentan una importante actividad analgésica frente al dolor crónico, neuropático y antiinflamatorio (22). Los receptores CB₁, que son altamente expresados en nociceptores aferentes primarios (43,62), y los CB₂, que modulan la liberación de citocinas pro-inflamatorias como la IL-6, IL-1 y el TNF α , son los responsables de la actividad analgésica de los cannabinoides.

5.6. Diabetes y complicaciones diabéticas

Situaciones de inflamación y estrés oxidativo juegan un importante papel en el desarrollo de la diabetes; y por tanto también aquellos sistemas que se encargan de su control, entre los que está el SCE. Por un lado la activación de receptores CB₁ provoca un incremento en la respuesta inflamatoria y la generación de especies altamente oxidantes como son los radicales ROS, contribuyendo al desarrollo de diabetes y complicaciones diabéticas. La estimulación de receptores CB₂ por el contrario las atenúa. De esta manera antagonistas CB₁ (63) y agonistas CB₂ presentarían utilidad terapéutica en esta enfermedad (64). El CBD, por ejemplo, al presentar propiedades antiinflamatorias y antioxidantes ha demostrado ejercer un efecto beneficioso frente a diversas situaciones patológicas derivadas de la diabetes como puede ser la retinopatía diabética y las complicaciones cardíacas (49,63,64).

5.7. Glaucoma

La presencia en el ojo de receptores por los que tienen afinidad los cannabinoides, como los CB₁, CB₂ y los receptores vaniloides, pone de manifiesto la posible utilidad terapéutica de estos compuestos en el tratamiento de patologías oculares entre las que se encuentra el glaucoma, que se caracteriza por un incremento de la presión intraocular (PIO) y que puede desembocar en ceguera si no se trata. Diversos cannabinoides como el THC y el CBN han demostrado ser capaces de disminuir la PIO. El CBD sin embargo ha resultado inactivo. El mecanismo por el que ejercen este efecto hipotensor no está muy esclarecido, pero parece ser que envuelve a los receptores CB₁ (50, 65); pues antagonistas CB₁ pero no antagonistas CB₂ lo revierten. En esta patología se ha observado también un aumento de apoptosis de células ganglionares debido al estrés oxidativo generado. Los cannabinoides han demostrado ejercer también un efecto neuroprotector a este nivel (65,66).

A pesar del potencial terapéutico que presentan los cannabinoides en esta enfermedad, la aparición de efectos adversos como hipotensión sistémica o efectos psicoactivos dificultan su empleo. El uso de cannabinoides no psicoactivos o formulaciones tópicas supondrían una buena estrategia (27).

5.8. Asma.

Algunos cannabinoides como el THC y el Δ^8 -THC han demostrado tener un efecto broncodilatador y por tanto un potencial terapéutico en enfermedades respiratorias como el asma (50,67).

5.9. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica de origen autoinmune caracterizada por inflamación y deformación de las articulaciones (52) frente a la que algunos cannabinoides como el CBD, debido a sus propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras, han demostrado cierta eficacia. (29,52).

5.10. Depresión y ansiedad

El cannabis ha demostrado tener efectos beneficiosos en determinados trastornos psíquicos como trastornos bipolares, manía, ansiedad o depresión (50). El CBD presenta propiedades antidepresivas (50) y ansiolíticas (29,68,69). Aunque aún no se sabe bien los mecanismos moleculares responsables de estas acciones, parece ser que son los receptores 5-HT_{1A} los implicados en el efecto ansiolítico (29).

6. EFECTOS ADVERSOS Y ADICCIÓN AL CANNABIS

Uno de los principales problemas que plantea el uso del cannabis y que limita su utilidad terapéutica es la presencia de efectos psicoactivos. El principal responsable de estos efectos es el THC, que mediante la activación de receptores CB₁ produce inicialmente una sensación de relajación, alegría y locuacidad; y psicosis, comportamientos depresivos y problemas de memoria a largo plazo (1). Debido a su capacidad de activar el sistema de recompensa, el cannabis tiene un potencial adictivo y su consumo crónico genera tolerancia y dependencia (1, 70,71). El síndrome de abstinencia que presenta no es tan severo como en otras drogas de abuso, como la cocaína, y se caracteriza por irritabilidad, alteraciones en la frecuencia cardíaca, hipersudoración, insomnio y diarrea (1,71).

Debido a que el mecanismo responsable de todos estos efectos psicoactivos característicos del cannabis es la activación de receptores CB₁ centrales, el empleo de cannabinoides no psicoactivos como el CBD y de agonistas selectivos CB₂, o el desarrollo de formulaciones de acción local que no atraviesen la barrera hematoencefálica, suponen una buena estrategia para solventar estos efectos negativos y aprovechar el potencial terapéutico de los cannabinoides.

7. FORMAS DE ADMINISTRACIÓN

El uso terapéutico de la marihuana como tal ha sido objeto de una gran polémica. Hay quien se postula a favor, fundamentalmente en tratamientos

paliativos en enfermos de cáncer y sida, argumentando sus efectos beneficiosos, y quien en contra debido sobre todo a sus efectos psicoactivos. El principal inconveniente que presenta el empleo de la marihuana como tal con respecto al uso de los cannabinoides aislados es la variabilidad en la proporción de los diferentes cannabinoides, pues ésta depende de numerosos factores como son las condiciones de cultivo, de preparación y de almacenamiento; haciendo muy complicado su estandarización. Sin embargo podría presentar ciertas ventajas, pues el empleo de extractos de la planta podría ser más efectivo que el uso de cannabinoides aislados debido al efecto sinérgico que tendrían los diferentes cannabinoides entre sí (72,73). En cuanto al propio THC, numerosos componentes presentes en el cannabis son capaces de paliar, en parte, sus efectos psicoactivos.

Respecto a las formas de consumo de marihuana, las más habituales son el cigarrillo, las pipas de agua y la ingesta en alimentos dulces como pasteles. La marihuana fumada tiene la ventaja de la alta biodisponibilidad y el rápido inicio de acción con respecto a la oral, que se caracteriza por una biodisponibilidad mucho menor. No obstante fumar marihuana tiene los inconvenientes el riesgo de desarrollar enfermedades pulmonares y cáncer, al entrar en contacto con productos derivados de la combustión (74).

En la mayor parte de los países, la posesión, el consumo y la venta de marihuana están prohibidos y sancionados desde el punto de vista legislativo, a excepción de Holanda donde se permite la venta y consumo de estos preparados en establecimientos debidamente autorizados (los denominados coffee shops). No obstante en algunos estados de Estados Unidos, como California, y en Canadá (74) el uso de la marihuana con fines medicinales está autorizado.

En cuanto a los medicamentos a base de cannabinoides, se encuentran aprobados y comercializados en diversos países, entre ellos Estados Unidos, Alemania, Argentina, Austria, Canadá, España, Finlandia, Israel, Portugal y Nueva Zelanda. Estas formulaciones son en la actualidad:

- Marinol ®: son cápsulas de dronabinol (THC sintético) y están indicadas como estimulante del apetito para evitar la pérdida masiva de peso asociada al síndrome de desgaste en pacientes con SIDA, y para combatir los vómitos y náuseas debido al tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer (60).

- Sativex ®: spray en forma de aerosol de administración oral que contiene THC y CBD en proporciones 1:1 y que se emplea para la espasticidad asociada a la esclerosis múltiple en diversos países europeos, Nueva Zelanda y Canadá. En este último además está indicado para combatir el dolor neuropático asociado a la esclerosis múltiple y el dolor oncológico (60).

- Cesamet ®: cápsulas duras de nabilona (análogo sintético de THC) que se emplea para prevenir los vómitos y náuseas derivados de la quimioterapia en pacientes con cáncer (60).

- El rimonabant fue también aprobado y comercializado para el tratamiento de la obesidad (50). Sin embargo debido a los efectos adversos de carácter psiquiátrico que ocasionaba tales como depresión e ideas suicidas fue retirado.

8. CONCLUSIONES

La participación del SCE en numerosas funciones fisiológicas, y las propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras y antioxidantes que presentan los cannabinoides, los convierte en potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades como trastornos metabólicos, neurológicos, autoinmunes o incluso la terapia antitumoral. No obstante los efectos adversos psicoactivos que caracterizan al cannabis limitan su uso terapéutico. El empleo de cannabinoides no psicoactivos como el CBD o de agonistas selectivos CB₂, el desarrollo de formulaciones de acción local que no atraviesen la barrera hematoencefálica, o la formulación de estas moléculas en sistemas que faciliten su vehiculización y modulen su liberación en el organismo pueden ser una buena herramienta para evitar estos efectos y aprovechar las acciones de los cannabinoides en terapéutica.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Szulakowska, A.; Milnerowicz, H. Cannabis sativa in the Light of Scientific Research. *Adv Clin Exp Med* 16 (6), 807-815 (2007).
2. Izzo, A. A.; Sharkey, K. A. Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther* 126 (1), 21-38 (2010).
3. Guindon, J.; Hohmann, A. G. The endocannabinoid system and cáncer: therapeutic implication. *Br J Pharmacol* 163 (7), 1447-1463 (2010).
4. Hermanson, D. J.; Marnett L. J. Cannabinoids, Endocannabinoids and Cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30 (3-4), 599-612 (2001).
5. Happyana, N.; Agnolet, S.; Muntendam, R.; Van Dam A.; Schneider, B.; Kayser, O. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal Cannabis sativa using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry* 87, 51-59 (2013).
6. Kalant, H. Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain Res Manag* 6 (2), 80-91 (2001).
7. Mikuriya, T. H. (1969). Marijuana in medicine: past, present and future. *Calif Med* 110 (1), 34-40.
8. Touw, M. The religious and medicinal uses of cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs*, 13 (1), 23-31 (1981).
9. Mechoulam, R.; Parker, L.A. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu Rev Psychol*. 64, 21-47 (2013).
10. Micale, V.; Di Marzo, V.; Sulcova, A.; Wotjak, C. T.; Drago, F. Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. *Pharmacol Ther* 138, (1), 18-37 (2013).

11. Ben Amar, M. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol*, 105 (1-2), 1-25 (2006).
12. Hosking, R. D.; Zajicek, J. P. Therapeutic potential of cannabis in pain medicine. *Br J Anaesth* 101 (1), 59-68 (2008).
13. Pandey, R.; Mousawy, K.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res*, 60 (2), 85-92 (2009).
14. Thakur, G. A.; Duclos, R. I. Jr; Makriyannis, A. Natural cannabinoids: templates
15. Matias, I.; Di Marzo, V. Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance. *J Endocrinol Invest*, 29, 15-26. (2006).
16. Piomelli, D.; Giuffrida A.; Calignano, A.; Rodríguez de Fonseca, F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci*, 21 (6), 218-224 (2000).
17. Felder, C.C.; Dickason-Chesterfield, A.K.; Moore, S. A. Cannabinoids biology: the search for new therapeutic targets. *Mol Interv*, 6 (3), 149-161.
18. McFarland, M.J.; Barker, E.L. Anandamide transport. *Pharmacol Ther*, 104 (2), 117-135 (2004).
19. Guzmán, M.; Sánchez, C.; Galve-Roperh, I. Control of the cell survival/death by cannabinoids. *J Mol Med (Berl)*, 78 (11), 613-625 (2001).
20. Hirst, R. A.; Lambert, D. G.; Notcutt, W. G. Pharmacology and potential therapeutic uses of cannabis. *Br J Anaesth*, 81 (1), 77-84 (1998).
21. McAllister, S. D.; Glass, M. CB1 and CB2 receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66 (2-3), 161-171 (2002).
22. Fine, P. G.; Rosenfeld, M. J. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides Med J*, 4 (4), 1-15 (2013).
23. Velasco, G.; Galve-Roperh, I.; Sánchez, C.; Blázquez, C.; Guzmán, M. Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas?. *Neuropharmacology*, 47 (3), 315-323 (2004).
24. Velasco, G.; Galve-Roperh, I.; Sánchez, C.; Blázquez, C.; Haro, A.; Guzmán, M. Cannabinoids and ceramide: two lipids acting hand-by-hand. *Life Sci*, 77 (14), 1723-1731 (2005).
25. Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365 (6441), 61-65 (1993).
26. Herkenham, M.; Lynn, A. B.; Johnson, M. R.; Melvin, L.S.; De Costa, B. R.; Rice, K.C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, 11 (2), 563-583 (1991).
27. Henstridge, C.M.; Balenga, N. A.; Kargl, J.; Andradas, C.; Brown, A. J.; Irving, A.; Sanchez, C.; Waldhoer, M. Minireview: Recent Developments in the Physiology and Pathology of the Lysophosphatidylinositol-Sensitive Receptor GPR55. *Mol Endocrinol*, 25 (11), 1835-1848 (2011)
28. Sylantsev, S.; Jensen, T. P.; Ross, R. A.; Rusakov, D. A. Cannabinoid and lysophosphatidylinositol sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110 (13), 5193-5198 (2013).
29. Izzo, A. A.; Borrelli, F.; Capasso, R.; Di Marzo, V.; Mechoulam, R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci*, 30 (10), 515-527 (2009).
30. Henstridge, C. M. Off target cannabinoid effects mediated by GPR55. *Pharmacology*, 89 (3-4), 179-187 (2012).
31. Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjögren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N. O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P. J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152 (7), 1092-1101 (2007).
32. Tominaga, M.; Tominaga, T. Structure and function of TRPV. *Pflugers Arch*, 451 (1), 143-150 (2005).
33. Kola, B.; Boscaro, M.; Rutter, G. A.; Grossman, A. B.; Korbonits, M. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab*, 17 (5), 205-215 (2006).
34. Van Thuijl, H.; Kola, B.; Korbonits, M. Appetite and metabolic effects of ghrelin and cannabinoids: involvement of AMP-activated protein kinase. *Vitam Horm*, 77, 121-148 (2008).
35. Porter, A. C.; Felder, C. C. The endocannabinoid nervous system: Unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther*, 90 (1), 45-60 (2001).
36. Solinas, M.; Goldberg, S. R.; Piomelli, D. The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol*, 154 (2), 369-383 (2008).

37. Matias, I.; Bisogno, T.; Di Marzo, V. Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obes (Lond)*, 30 (Suppl 1) S7-S12 (2006).
38. Brown, T. T.; Dobs, A. S. Endocrine effects of marijuana. *J Clin Pharmacol*, 92 (11 suppl), 90S-96S (2002).
39. Battista, N.; Rapino, C.; Di Tommaso, M.; Bari, M.; Pasquariello, N.; Maccarrone, M. Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Mol Cell Endocrinol*, 286 (1-2 suppl 1), 17S-23S (2008).
40. Cota, D. The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol*, 20 (suppl 1):35-38 (2008).
41. Sun, Y.; Alexander, S. P.; Garle, M. J.; Gibson, C. L.; Hewitt, K.; Murphy, S. P.; Kendall, D. A.; Bennett, A. J. Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol*, 152 (5), 734-743 (2007).
42. O'Sullivan, S. E. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*, 152 (5), 576-582 (2007).
43. Duran, M.; Laporte, J. R.; Capellà, D. Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del Cannabis y el sistema cannabinoide. *Med Clin (Barc)*, 122 (10), 390-398 (2004).
44. Lunn, C. A.; Fine, J. S.; Rojas-Triana, A.; Jackson, J. V.; Fan, X.; Kung, T.T.; Gonsiorek, W.; Schwarz, M. A.; Lavey, B.; Kozłowski, J. A.; Narula, S. K.; Lundell, D. J.; Hipkin, R. W.; Bober, L. A. A novel cannabinoid peripheral cannabinoid receptorselective inverse agonist blocks leukocyte recruitment in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 316 (2), 780-788 (2006).
45. Howlett, A.C.; Barth, F.; Bonner, T.I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W. A.; Felder, C. C.; Herkenham, M.; Mackie, B. R.; Mechoulam, R.; Pertwee, G. International Union of Pharmacology XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*; 54:161-202 (2002).
46. Pertwee, R. G. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol*; 13 (2), 147-159 (2008).
47. Sagredo, O.; García-Arencibia, M.; De Lago, E.; Finetti, S.; Decio, A.; Fernández-Ruiz, J. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol*, 36 (1), 82-91 (2007).
48. Pacher, P.; Kunos, G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease-successes and failures. *FEBS J*, 280 (9):1918-1943 (2013).
49. Booz, G. W. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 51 (5), 1054-1061 (2011).
50. Kogan, N. M.; Mechoulam, R. Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 9 (4), 413-430 (2007).
51. Fernández-Ruiz, J.; Romero, J.; Velasco, G.; Tolón, R. M.; Ramos, J. A.; Guzmán, M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?. *Trends Pharmacol Sci*; 28 (1), 39-45 (2007).
52. Croxford, J. L.; Yamamura, T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases?. *J Neuroimmunol*, 166 (1-2), 3-18 (2005).
53. Baker, D.; Jackson, S. J.; Pryce, G. Cannabinoid control of neuroinflammation related to multiple sclerosis. *Br J Pharmacol*, 152 (5), 649-654 (2007).
54. Baker, D.; Pryce, G. The endocannabinoid system and multiple sclerosis. *Curr Pharm Des*, 14 (23), 2326-2336 (2008).
54. Fernández-Ruiz, J.; Romero, J.; Velasco, G.; Tolón, R. M.; Ramos, J. A.; Guzmán, M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?. *Trends Pharmacol Sci*; 28 (1), 39-45 (2007).
55. Ryan, D.; Drysdale, A. J.; Lafourcade, C.; Pertwee, R. G.; Platt, B. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *J Neurosci*, 29 (7) 2053-2063 (2009).
56. Croxford, J. L.; Yamamura, T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases?. *J Neuroimmunol*, 166 (1-2), 3-18 (2005).
56. Saito, V. M.; Rezende, R. M.; Teixeira, A. L. Cannabinoid modulation of neuroinflammatory disorders. *Curr Neuropharmacol*, 10 (2), 159-66 (2012).
57. Aso, E.; Ferrer, I. Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Front Pharmacol*, 5, 1-11 (2014).
58. Ruiz-Valdepeñas, L.; Benito, C.; Tolón, R. M.; Martínez Orgado, J. A.; Romero, J. The endocannabinoid system and amyloid-related diseases. *Exp Neurol*, 224 (1), 66-73 (2010).

59. Alexander, A.; Smith, P. F.; Rosengren, R. J. Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Lett*, 285 (1), 6-12 (2009).
60. Engels, F. K.; De Jong, F. A.; Mathijssen, R. H.; Erkens J. A.; Herings, R. M.; Verweij, J. Medicinal cannabis in oncology. *Eur J Cancer*, 43 (18), 2638-2644 (2007).
61. Brown, I.; Cascio, M. G.; Rotondo, D.; Pertwee, R. G.; Heys, S. D.; Wahle, K. W. Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators. *Prog Lipid Res*, 52 (1), 80-109 (2013).
62. Baker, D.; Pryce, G.; Giovannoni, G. Thompson, A. J. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol*, 2 (5):291-298 (2003).
63. Di Marzo, V.; Piscitelli, F.; Mechoulam, R. Cannabinoids and endocannabinoids in metabolic disorders with focus on diabetes. *Handb Exp Pharmacol*, (203), 75-104 (2011).
64. Horváth, B.; Mukhopadhyay, P.; Haskó, G.; Pacher, P. The endocannabinoid system and plant-derived cannabinoids in diabetes and diabetic complications. *Am J Pathol.*, 180 (2), 432-442 (2012).
65. Pinar-Sueiro, S.; Rodríguez-Puertas, R.; Vecino, E. Aplicaciones de los cannabinoides en glaucoma. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 86 (1), 16-23 (2011).
66. Tomida, I.; Pertwee, R. G.; Azuara-Blanco, A. Cannabinoids and glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 88 (5), 708-713 (2004).
67. Abboud, R. T.; Sanders, H. D. Effect of oral administration of delta-tetrahydrocannabinol on airway mechanics in normal and asthmatic subjects. *Chest*, 70 (4), 480-485 (1976).
68. Guimarães, F. S.; Chiaretti, T. M.; Graeff, F. G.; Zuardi, A. W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 100 (4), 558-559 (1990).
69. Guimarães, F. S.; De Aguiar, J. C.; Mechoulam, R.; Breuer, A. Anxiolytic effect of cannabidiol derivatives in the elevated plus-maze. *Gen Pharmacol*, 25 (1) 161-164 (1994).
70. Hall, W. The adverse health effects of cannabis use: What are they, and what are their implications for policy?. *Int J Drug Policy.*, 20 (6), 458-466 (2009).
71. Danovitch, I.; Gorelick, D. A. State of the art treatments for cannabis dependence. *Psychiatr Clin North Am*, 35 (2), 309-326 (2012).
72. McPartland, J. M.; Russo, E. B. Cannabis and cannabis extracts: greater than the sum of their parts?. *J Cannabis Ther.*, 1, (3-4), 103-132 (2001).
73. Russo, E. B.; McPartland, J. M. Cannabis is more than simply D9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology*, 165 (4), 431-432 (2003).
74. Hall, W.; Christie, M.; Currow, D. Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation. *Lancet Oncol*, 6 (1), 35-42 (2005).

Pharmacists in German Cultural History

Christoph Friedrich*

Institut für Geschichte der Pharmazie, Roter Graben 10, D- 35032 Marburg

*e-mail: ch.friedrich@staff.uni-marburg.de

Recibido el 8 de octubre de 2014

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 3 (2014), pag.600-613

ABSTRACT

This paper offers an overview on famous pharmacists who became well-known as poets or novelists, performing artists or musicians. In the 18th and 19th centuries, we find pharmacists as writers of natural-scientific works, but also of poetry and literature, such as Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837), who also wrote fairy tales. Other pharmacists published autobiographies and travelogues. Among the poets coming from a pharmacist background is Ludwig Bechstein (1801–1860), who set his mark on literature history by writing fairy tales, poems, historical novels and travelogues. A writer of world ranking was Theodor Fontane (1819–1898), son of a pharmacist, who started his pharmaceutical education in Berlin. In his autobiographical works as well as in his novel “Effi Briest”, he also writes about pharmacists. Another one of his novels, “All Kinds of Luck”, in which a pharmacist is the protagonist, remained fragmentary. Among the poets who came from a pharmaceutical background is also the dramatist and novelist Hermann Sudermann (1857–1928), whose “Lithuanian Stories” and his novel “Lady Sorrow” are read in Germany even today. In his autobiography he recounts his education in a pharmacy. The expressionist lyricist Georg Trakl (1887–1914) was also a pharmacist, he studied pharmacy in Vienna and worked as a military pharmacist. At the beginning of the First World War, he committed suicide. Along with pharmacists who painted the illustrations for their scientific works themselves, Carl Spitzweg (1808–1885) and Behrend Goos (1815–1885) became the most famous representatives. But also on the musical field some pharmacists became known such as Eduard Lucerna (1869–1944), who wrote an opera, ten symphonies, chamber music and songs. Heinz Höhne (1892–1968) composed the song “High on the Yellow Chariot” which became one of the most popular songs in Germany. Finally, there are also some famous singers coming from the pharmacist profession. Thus, pharmacists marked the cultural life in Germany to some extent.

Keywords: pharmacists; cultural life; German history.

RESUMEN

Este trabajo ofrece una panorámica de farmacéuticos famosos que se dieron a conocer como poetas o novelistas, artistas o músicos. En los siglos XVIII y XIX se encuentran farmacéuticos escritores de trabajos en ciencias naturales pero también de poesía y literatura como Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837), que escribió también cuentos de hadas. Otros farmacéuticos publicaron biografías y libros de viajes. Entre los poetas provenientes de un entorno farmacéutico se encuentra Ludwig Bechstein (1801–1860), que dejó huella en la historia de la literatura al escribir cuentos de hadas, poemas, novelas históricas y libros de viajes. Un escritor conocido en todo el mundo fue Theodor Fontane (1819–1898), hijo de farmacéutico que empezó su educación farmacéutica en Berlín. En su trabajo autobiográfico, así como en su novela “Effi Briest”, escribe sobre farmacéuticos. Otra de sus novelas “All Kinds of Luck”, en la que un farmacéutico es el protagonista, solo quedan fragmentos. Entre los poetas que vienen de antecedentes familiares farmacéuticos se encuentra el dramaturgo y novelista Hermann Sudermann (1857–1928), cuyas “Lithuanian Stories” y su novela “Lady Sorrow” se leen en Alemania hoy en día. En su autobiografía reconoce su educación en una farmacia. El lírico expresionista Georg Trakl (1887–1914) fue también farmacéutico, estudió Farmacia en Viena y trabajó como farmacéutico militar. Al comienzo de la Primera Guerra Mundial se suicidó. Entre los farmacéuticos que ilustraron sus trabajos científicos Carl Spitzweg (1808–1885) y Beherend Goos (1815–1885) son los más representativos, pero también en el campo musical algunos farmacéuticos son bien conocidos, como Eduard Lucerna (1869–1944), que escribió una ópera, diez sinfonías, música de cámara y canciones. Heinz Höhne (1892–1968) compuso la canción “High on the Yellow Chariot” que llegó a ser una de las canciones más populares en Alemania. Finalmente hay famosos cantantes que provienen de la profesión farmacéutica. De este modo los farmacéuticos marcaron la vida cultural en Alemania hasta cierto punto.

Palabras clave: farmacéuticos; vida cultural; historia alemana.

1. INTRODUCTION

The German nation incurred much guilt during the time of World War II in the period of National Socialism. Yet, Germany is still generally considered to be the ‘land of poets and philosophers’ – and one can even add ‘of artists’. It was here where the great poets Johann Wolfgang von Goethe (1749–1832) and Friedrich Schiller (1759–1805) lived, just as the novelists Thomas Mann (1875–1955) and Theodor Fontane (1819–1898). Among the most significant painters were Albrecht Dürer (1471–1528), Lucas Cranach (1472–1553), Caspar David Friedrich (1774–1840) as well as Carl Spitzweg (1808–1885). Eventually, among the outstanding Germans we count Johann Sebastian Bach (1685–1750), Georg Friedrich Händel (1685–1759), Ludwig van Beethoven (1770–1827) and Richard Wagner (1813–

1883). They all created world-class works. Yet, it is only known to few that some of them were practicing the profession of a pharmacist, such as the poet and novelist Theodor Fontane, like wise the painter Carl Spitzweg. This should be reason enough to take a closer look at the importance of pharmacists for the German cultural history. Initially, artists arising from their occupation as pharmacists are considered, in the second part it is intended to examine the depiction of pharmacists, i.e. their representation in visual arts, literature and music.

WRITING PHARMACISTS AT THE TURN FROM THE 18TH TO THE 19TH CENTURY

Since the Renaissance in literary studies, poets have been regarded as imitators of nature and as creators of an elevated new world. At the end of the 18th and at the beginning of the 19th century pharmacists, increasingly focused on nature. Scientifically interested pharmacists were involved with studies of nature not limited to pharmaceutical topics. In this period we can find pharmacists as writers in the natural sciences: they composed works such as chemical, technological, botanical, zoological and physical text- and handbooks as well as reference books and studies in various fields of the natural sciences. Moreover, the pharmacists Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837) and Johann Friedrich Götting (1753–1809) founded their learned journals (1). As a matter of course they appeared as authors of books and magazines. This strongly influenced their relation to the written word. Unsurprisingly, such pharmacists contributed to the range of literature and fiction. Among these works were e.g. ‘occasional’ poems for weddings or birthday parties as well as for academic or professional jubilees, which were composed by colleagues or students of the pharmacist in question. But beyond these pieces of work we also find independent compositions.

For instance, the pharmacist and contemporary of Goethe, Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837), wrote fairy tales resembling his poetic inclination and phantasy (2). However, preferred genres for writing pharmacists were autobiographies and travelogues. The last of which are commonly associated with the personal interests of an author, in particular pharmacists in the botanical field gave detailed reports on their tours after gathering their collections. Autobiographies, in contrast, reflect much about the contemporary atmosphere of life and express a certain literary talent when depictions go beyond professional occupations.

One of the best pharmacist autobiographies is ‘Memories from the 90 Years of my Life’ by Ernst Wilhelm Martius (1756–1849). The history of our research on the emergence of this work resembles his struggle in writing and placing his life in the context of his time. For this reason, we find reports about the conditions at the University of Erlangen, in particular regarding medicine and pharmacy, as well as on the French Revolution and famous contemporaries such as the Countess of



Figure 1.- Ludwig Bechstein.

Cosel (1680–1765) and alchemist Count Alessandro Cagliostro (1743–1795). Nevertheless, such poetic works must be considered by-products of writing pharmacists – their main focus was on natural scientific works and on editing journals (3).

WRITING PHARMACISTS IN THE LATE 19TH AND THE 20TH CENTURY

After 1860, experimental chemical research shifted from pharmacies to university laboratories. The methodological and instrumental boom of chemistry and the plenty

fullness of specialist literature contributed to the effect that scientifically interested pharmacists became more passive in the field of chemistry. They transferred their activities to descriptive sciences like botany and zoology or they occupied themselves as gatherers. Within these domains numerous books were composed depicting native wildlife. Pharmacists remained perceptible specialist writers in the late 19th century (4).

Aside, many pharmacists chose their profession rather for pragmatic reasons. At that time the period of training was short and enabled young men to earn their living. This fact and the increasing esteem of the profession attracted people who wanted to be promoted in the 19th century. Children of poorer families chose this particular profession because it would allow for advancement to become a pharmacy owner, often by marriage, a natural scientist or a factory owner (5). Some became pharmacists despite their artistic talent in order to earn their living alongside with their artistic activity; they attempted to produce artworks that would enable them to dedicate themselves to their work as an artist or writer.

The poet Ludwig Bechstein (1801–1860) (Figure 1) belongs to this latter category. In his autobiography, he confesses to have been a poor child, neglecting his illegitimate descent. He was adopted and brought up by his uncle Johann Matthäus Bechstein (1757–1822), the writer of a few natural scientific works who tried to inspire his nephew. Because Ludwig Bechstein was no successful pupil at school, he started his apprenticeship as a pharmacist in Arnstadt, Thuringia (Figures 2, 3), in 1818 (6). He soon recognized that he had little enthusiasm for pharmaceutical operations – “to make capsules and signatures, to line boxes, to cut teas and roots, to refill empty glasses or tins and to sell drugs” (7) – this occupation

meant no satisfaction to him. That is why he started writing poems. After he finished his apprenticeship in 1822, he still remained in the Arnstadt pharmacy for two additional years. In 1824, he moved to Meiningen and two years later to Salzungen. Here again, he did not enjoy his profession. He improved his low income by means of an extra salary as a writer. In 1828 he released his volume of poetry titled 'Sonnet Chaplets' ('Sonettenkränze') and attracted the attention of the young Duke Bernhard Erich Freud of Saxony-Meiningen (1800–1882). He sponsored him three years of academic studies of philosophy, history, literature and arts in Leipzig and Munich. Bechstein was now able to abandon his unloved job as pharmacist. In 1831 he returned to Meiningen and became the ducal librarian. His work as a poet contains a collection of popular fairy tales and legends as well as historical novels, poems and travelogues in which he proves himself to be a careful observer of nature. His detailed descriptions of plants, animals, minerals and stars echo the scientifically skilled eye of a botanizing pharmacist. Likewise, his "tendency towards the mystical and mysterious" does not appear to be untypical of a pharmacist (6).



Figure 2.- Bechstein pharmacy in Arnstadt.

The pharmacist and poet Theodor Fontane (1819–1898) (Figure 4) had a profound impact on the German historical and social novels. As the son of a pharmacist he gained an early insight into this profession and does not seem to have started his apprenticeship reluctantly. In his autobiography 'From Twenty to Thirty' ('Von Zwanzig bis Dreißig'), he fondly illustrates his time as an apprentice. It was with Wilhelm Rose (1792–1867), the son of a famous pharmacist from Berlin and owner of the pharmacy 'To the White Swan' ('Zum weißen Schwan'), who was

Fontane's instructor. He did a good exam and became a first-class pharmacist attending a scientific training in the 'Court Pharmacy' ('Hof-Apotheke') in Berlin and at the Collegium medicum. The city physicus of Berlin, Dr. Natorp, attested him "good knowledge of chemistry, pharmacy, botany and Latin" (8).



Figure 3.- Bechstein pharmacy in Arnstadt.

In 1840, Fontane started to work as an assistant in the pharmacy of Burg with a very mean chief named Kannenberg. Fontane was lucky to move to Leipzig in 1841 already where he worked in the pharmacy 'To the White Eagle' ('Zumweißen Adler') of Mr. A. Neubert. In 1842, he moved to Dr. Gustav Adolf Struwe (1781–1840), the owner of the 'Salomonis Pharmacy' in Dresden. In his autobiography Fontane characterizes him as the "absolute number one in Germany, I would even say worldwide, and he really deserved this reputation" (8).

He returned to Berlin in 1845 to Julius Edmund Schacht (1804–1871), a committed political pharmacist representative who received an honorary doctorate of the University of Greifswald in 1858. In Berlin, Fontane was friend with Friedrich Witte (1829–1893), an apprentice from Rostock, who later opened up a pharmaceutical firm; they kept in contact (9). After Fontane's first-class degree with the botanist Heinrich Link (1767–1851) and other auditors, Fontane was assigned the first-class licence to practice pharmacy in 1847.

Meanwhile, Fontane was engaged to Emilie Rouanet-Kummer (1824–1902) and was looking for a pharmacy he could buy, but each attempt failed. Then he witnessed the revolution of 1848 which Fontane illustrates in his autobiography as a promising event for himself and his friends. Arranged by pastor Ferdinand Schulz

(1811–1875), a family friend, he started a job in the Deaconess Hospital Bethanien in Kreuzberg, Berlin. His task was to prepare two deaconesses for their examination and to work in the hospital pharmacy. Both women passed their exams very well, which is evidence of Fontane's pharmaceutical knowledge. After this job he considered his future and decided to abandon the pharmacist profession, because he feared to end up like his father. His father Louis Henri Fontane (1796–1867) was a gifted man, a delightful narrator, but also a gambler and drinker.

Theodor Fontane realized that his fortune did not suffice to buy a good pharmacy, so he quitted his profession. In the following years he worked as editor, corrector, press agent and finally as the secretary of the Academy of Arts in Berlin. In 1878 he published his first novel 'Before the Storm' ('Vordem Sturm') (8).



Figure 4.- Theodor Fontane.

Only one year later Fontane mentioned plans for a contemporary novel titled 'All Kinds of Luck' ('Allerlei Glück'), the protagonist of which was a pharmacist who resembled his former master Wilhelm Rose very much. However, the novel remained fragmentary, but Fontane incorporated many sketchily drawn characters and milieu depictions in his later works. The publishers rather preferred shorter narrations or novellas. Besides, Fontane did not want to be distinguished as a 'writing pharmacist' (10).

In 1892, Fontane was taken ill with an age-related depression. His physician was about to admit him to a mental asylum. Fontane believed that he would die at the age of 72 like his father. When he was recovering – without medicine which he as a former pharmacist was disinclined to take – his doctor recommended, "If you want to get well again, write." Fontane started to write down his childhood memories and proceeded with his novel 'Effi Briest'. In both works pharmacist characters appear: his own father in his childhood memories and Dr. Alonzo Gieshübler in 'Effi Briest', the last of which without a doubt shares features of his father, and according to Georg Urdang he is "one of the most likeable, though authentic representatives of his profession ever created by a writer." Gieshübler, who affirmed that he had never been young, is presented as an exceedingly positive figure feeling a lot of sympathy for other people (8).

Another writer originating from the profession of pharmacists is the dramatist and novelist Hermann Sudermann (1857–1928), whose dramas were successful in Berlin and other theatres in his lifetime. Currently, Sudermann is

largely forgotten, apart from his 'Lithuanian Stories' ('Litauische Geschichten') or his novel 'Lady Sorrow' ('Frau Sorge'). Sudermann was born as the son of a brewery tenant in the utmost East of Germany, in the Klaipėda Region, the Memel Territory, in East Prussia. Because of his parents' financial limits he had to drop out of secondary school in Elbing ahead of time. As he later wrote, he chose to work as a pharmacist which he regarded as half of a chemist (11). In his autobiographical memories 'The Picture Book of my Youth' ('Das Bilderbuch meiner Jugend') from 1922, he dedicates an entire chapter to his apprenticeship. The chief of his pharmacy is illustrated as a sympathetic person who never showed any outburst of anger, even when the overzealous Sudermann crashed a precious mortar. As a consequence of a knee injury, which he received from a scuffle in his schooldays, he was eventually forced to break off his unloved apprenticeship ahead of time. He confessed: "The evil brute having thrown me against the hinge was my saviour, otherwise I would still stand in front of the preparation table and brew expectorant influenza drinks" (12).

The poet and pharmacist Georg Trakl (1887–1914), who became a famous expressionistic lyricist, stuck to his profession until the end of his life, even though enforced. Trakl was born as the fourth of seven children of the iron trader Tobias Trakl in Salzburg. As a pupil he already showed great interest in literature and lyric. Because he did not pass class seven, his father determined him to become a pharmacist. In 1905 Trakl began his apprenticeship in Carl Hinterhuber's Pharmacy 'To the White Angel' ('Zumweißen Engel') in the 'Linzer Gasse'. Hinterhuber was an old man, a heavy drinker and in his pharmacy Trakl made his first experience with narcotics, as the poem 'The Sleep' ('Der Schlaf') of that time demonstrates: "Not your dark poisons again / White sleep! / This fantastically strange garden / Of trees in deepening twilight / Fills up with serpents, nightmoths, / Spiders, bats" (13).

In the autumn of 1918, he started studying pharmacy at the University of Vienna in the regular course of four terms. Among others, his teachers were the professor of chemistry, Zdenko Hans Skraup (1850–1910), who synthesized quinoline for the first time, which was temporarily also used as an antipyretic. Another famous teacher of Trakl's was Joseph Moeller (1848–1924), co-author of the important pharmaceutical ten-volumed 'Real-Encyclopädie der gesamten Pharmazie' (14).

After his examination as a magister, Trakl worked for a short time in the 'White Ange Pharmacy' again, but he could not stand the hectic everyday life there. In 1910, he began a voluntary one-year military service in Vienna. Alongside he wrote poems and faced the common dilemma of an artist's life. Working as a pharmacist, he could not spare much time for writing, but to be able to write he depended on earning money to earn his living. In 1912 he started to work as a

military drug officer in the garrison hospital of Innsbruck, which he soon quitted in September already. He gave up his position in the Ministry of Public Labour after two hours of work. Instead, he applied for a job as a pharmacy officer in the Ministry of War, got the job and had to check columns of numbers all day. Trakl was on sick leave and considered returning to the military. He applied for positions in the dispensaries of Vienna.

Even though his friends had given him lots of support, he proved himself incapable of living. The philosopher Ludwig Wittgenstein (1889–1951) – who had also been industrialist at that time – had offered a large amount of money to Trakl and Rainer Maria Rilke (1875–1926). Trakl should have received 20.000 Kronen (200.000 Mark) that would have eased his financial difficulties for a long period. Yet, he was unable to fetch the money, and stood trembling in front of the bank.

Fairly at the beginning of World War I, Trakl was conscripted into the army in October 1914. After strenuous marches through Galicia he experienced the Battle of Gródekto which he dedicated his last poem. He had to take care of 90 seriously wounded people almost without medicine in a barn. Trakl suffered from a nervous breakdown and attempted suicide, but his comrades took his gun away. Shortly thereafter, he was transferred to a garrison hospital in Kraków, as he believed in order to work as a military pharmacist. Indeed he was brought to the psychiatric department for the observation of his mental state. One of his friends reported that Trakl had lost the will to live. On November 3rd 1914 Trakl died of a cocaine overdose, presumably because he wanted to end his life.

Trakl was buried at the Rakowicki Cemetery in Kraków, in 1925 his mortal remains were transferred to the Mühlau Cemetery near Innsbruck. Trakl proved to be unable to lead a normal life, but he was capable of lyricism of enduring value under the most difficult circumstances. He wrote poems full of melancholia and mortal eroticism which illustrate his groping for myth and faith. Although he felt an inner distance towards the profession of a pharmacist, he has worked for a considerable part of his life as such (14).

PHARMACISTS AS VISUAL ARTISTS

Being involved in visual arts is not too far away from working as a pharmacist because either require precise observation of nature. Pharmacists must be able to recognize drugs or medicinal plants and identify them accurately. Consequently, some pharmacists directly illustrated natural objects, for instance Gottlieb Wilhelm Bischoff (1797–1854), professor in Heidelberg, who originally intended to become a painter. Apart from his occupation as a botanist he created paintings of high artistic value, for example for Carl Philipp Martius' (1794–1862) writing 'Nova genera et species plantarum, quas in itinere per Brasiliam' (15).

Friedrich Wilhelm Justus Baedeker (1788–1865), who owned a pharmacy in Witten (Ruhr), occupied himself with ornithological studies in his leisure time. 34 coloured tables for Brehm's natural history of all birds in Germany ('Handbuch der Naturgeschichte aller Vögel Deutschlands') illuminate his artistic talent (16).

Likewise, the pharmacist Berend Goos (1815–1885) (Figure 5) from Hamburg was devoted to painting. Goos, who was born as the son of a pastor in Hamburg, spent his time of apprenticeship with Dr. Georg Eimbicke (1771–1843), a student of the famous pharmacist Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837) from Erfurt. Afterwards he attended the private institute of Heinrich Wilhelm Wackenroder (1798–1874) in Jena and enrolled at the University of Kiel. He learned from Christian Heinrich Pfaff (1773–1852), a professor who had previously worked as a pharmacist. In 1839, he passed the pharmaceutical exam of Schleswig-Holstein. He acquired a pharmacy in Hamburg in 1842, which was destroyed by a big fire in the same year (17). It was one year later that Goos rebuilt his pharmacy at the town hall market square. An ear disease forced him to abandon his profession. From now on, Goos dedicated himself completely to painting. In the history of art he was highly regarded as a landscapist and in genre painting. Two pictures – 'The Raftsmen' ('Die Flößer') and the portrait of a man – are located in the 'Gallery of Art' ('Kunsthalle') in Hamburg (18).



Figure 5.- Berend Goos.

Without doubt the most important painter originating from the profession of a pharmacist was Carl Spitzweg (1808–1885). Spitzweg was born as the son of the merchant and member of parliament, Simon Spitzweg (1776–1828), in Munich. After Latin School he started his apprenticeship in 1825 in the 'City Pharmacy' ('Stadt-Apotheke') in Erding and continued in the 'Court Pharmacy' ('Hof-Apotheke') in Munich. This pharmacy was run by Franz Xaver Pettenkofer (1783–

1850), uncle and teacher of the famous hygienist Max von Pettenkofer (1818–1901). It was here that Carl Spitzweg started to draw interesting customers for his personal joy beside his studies of practical pharmacy. Some of these pictures – or rather drafts – still exist today. After the death of his father in 1828, he worked as an assistant in the ‘Lower City Pharmacy’ (‘Untere Stadt-Apotheke’) in Straubing until 1830. There he gained insights into the small-town ambience that Spitzweg illustrated with this superior big-city-humour of his later works. After his practical training, he studied pharmacy for two years at the University of Munich (19) with the professor and pharmacist Johann Andreas Buchner (1783–1852), Johann Bartholomäus Trommsdorff’s probably most important student. Buchner discovered Salicin, an active ingredient of the willow tree, serving as an anti-inflammatory drug and pain killer at that time, he discovered the alkaloid Berberine, edited the pharmaceutical journal ‘Repertory for the Pharmacy’ (‘Repertorium für die Pharmazie’) and he wrote the multi-volume opus ‘Complete Epitome of Pharmacy’ (‘Vollständiger Inbegriff der Pharmacie’). Like his teacher Trommsdorff, he substantially participated in the transformation of pharmacy from craft to science (20).

Spitzweg passed his pharmaceutical exam in 1832 with distinction, which can be traced back to Buchner’s influence. Afterwards he journeyed across Italy. Back to Munich, he fell ill with a nervous fever which annihilated his original plans. Instead of moving to Switzerland as a pharmacist’s assistant – as many Bavarian pharmacists did before buying their own pharmacy with their heritage – Spitzweg went to the health resort in Sulz, Peißenberg in 1833. There it was common that the bathers were employed in producing little pencil drawings, in presenting them to other guests in the evening. Spitzweg’s drawings were a sensation. The artistically inclined head of the institution, Dr. Zeus, and the landscapist Christian Heinrich Hanson (1791–1863) advised him to become a painter. Finally, he resolved to give up the pharmacist profession, he conducted natural studies. He avoided attending the Academy of Arts in Munich and prevented his pictures from being shaped by the academic pathos of the Munich school of thought of that time. In 1839 he dared go public and exhibit his picture ‘The Poor Poet’ (‘Der arme Poet’) in the ‘Munic Art Association’ (‘Münchner Kunstverein’) – a picture that counts to Spitzweg’s most famous ones. Yet, his picture failed what caused severe trouble to his self-confidence. In his studio at the ‘Heumarkt’ in Munich, high above the narrow streets, Carl Spitzweg created the idyllic world that was characteristic of himself. He tried new colour combinations and contrasted them to fine drawings and surfaces. In the 1860s the long-awaited success finally emerged (19, 21).

Spitzweg has now and again picked up pharmaceutical subjects in his paintings. In addition to the little drawings just mentioned the two pictures ‘The Alchemist’ (‘Der Alchimist’) and ‘The Provisor Fallen in Love’ (‘Der verliebte

Provisor’) are of importance. In other pictures ‘Stork Pharmacies’ (‘Storchen-Apotheken’) occur. Spitzweg was capable of establishing the pharmacist as a prominent motif in the Biedermeier period (21).

PHARMACISTS AS MUSICIANS

There is no direct link between pharmacy and music: Being a pharmacist does not require particular musical skills. However, we know several pharmacists making music. One of the pharmacists, scientifically recognized in the early 18th century already, was Caspar Neumann (1683–1737) from Berlin, the son of a musician and interested in music since early childhood. He was said to have made music together with King Frederic I of Prussia when Neumann was working as an assistant in the ‘Court Pharmacy’ (‘Hof-Apotheke’) in Berlin. It was reported that Neumann played the harpsichord while the king sang chorals. It was also because of his musical talent that the king promoted Neumann. He approved of Neumann’s educational journeys to various court pharmacies in 1711 and to Hermann Boerhaave (1668–1738) in Leiden as well as to Utrecht, Amsterdam and London, where he could extend his chemical-pharmaceutical knowledge considerably. In 1719, Neumann took over the ‘Court Pharmacy’. Since 1725, first-class pharmacists received a chemical training and lectures by Neumann there, so that they count as the first scientifically skilled pharmacists in Prussia, alongside second-class pharmacists who just received a practical manual training. Neumann was the author of some chemical-pharmaceutical writings, dealing with botanic analyses in particular. He examined thymol, ambergris, benzoic acid, cinnamic acid as well as tea, wine, coffee and beer (22).

Some pharmacists made music as a hobby, for instance Hermann Schelenz (1848–1922), the ‘father of the history of pharmacy’ who played the cello. Others dedicated themselves to musical compositions beside their pharmaceutical activities, for instance Eduard Lucerna (1869–1944), who was born in Klagenfurt, studied pharmacy in Graz and managed the pharmacy in Gries since 1900. He composed the opera ‘Zlatorog’, ten symphonies, chamber music and songs. In the last years of his life he was committed to compositions exclusively (22).

A song which became extremely popular in Germany was ‘Hoch auf dem gelben Wagen’ (‘High on the Yellow Carriage’) which was composed by the pharmacist Heinz Höhne (1892–1968) from Berlin. He was born in Pasewalk, started his apprenticeship in Graudenz in 1912 and continued in Putbus on the island of Rügen and in Magdeburg. He had to interrupt his training during World War I. and finished it in 1920. Afterwards, he studied pharmacy in Berlin and worked in the ‘Eagle Pharmacy’ (‘Adler-Apotheke’) in Berlin-Pankow from 1923 on, which he bought in 1936. After its socialisation in 1946 Höhne was an employee in a pharmacy in Zepernick. He retired in 1965. He composed his first

songs at the age of twelve, he attended composing lessons. On behalf of the 'Wilhelm Busch Society' he wrote songs based on Busch verses; and he composed string quartets and orchestral works (22).

The pharmacist Günther Baumgarten (1906–1989) was attended to making music and to composing in his leisure time alongside his position in the pharmaceutical industry at Johannes Bürger's Ysat factory in Wernigerode (in the Harz Mountains). Baumgarten grew up in Magdeburg and visited the local Gymnasium that he left with the German Abitur in 1925. He received his pharmaceutical training in the 'City Pharmacy' ('Stadt-Apotheke') in Coswig and began to study pharmacy in Berlin in 1928. Subsequently, he began his studies of chemistry. In 1933 he received his doctorate degree in pharmaceutical chemistry. In collaboration with Carl Mannich (1877–1947), he developed a determination method for Morphine. In the Ysat factory, he participated in the development of cardiovascular preparations. He composed songs and chamber music including a string quartet and orchestral works (22).

Finally, many pharmacists left their jobs in favour of a full-time musical employment like the professor and organ teacher at the Conservatory of Music in Leipzig, Paul Homeyer (1853–1908), the Wagner singer Wilhelm Sigler (1846–1919), the tenor Hans Siewert (1872–1941) and the baritone Karl Scheidemantel (1858–1923). He worked at the Court Opera in Dresden and sang the premiere of Franz Liszt's (1811–1886) 'The Legend of St. Elisabeth' ('Die Legende von der heiligen Elisabeth') in 1883 and the premiere of Richard Strauss's (1864–1949) 'The Knight of the Rose' ('Rosenkavalier') in 1911 (22).

To sum up, pharmacists have been of vital importance to the cultural life in Germany.

REFERENCES

1. Friedrich, Ch. Apotheker als Zeitschriftenredakteure. *Pharmazeutische Zeitung* **155**, 1248–1253 (2010).
2. Friedrich, Ch.; Götz, W.: Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837). *Zwischenbilanz der Forschung; Sonderschriften der Akademie gemeinnütziger Wissenschaften*, 29; Erfurt 1996.
3. Friedrich, Ch.; Garbe, A. Ernst Wilhelm Martius: Leben und Werk. *Pharmazeutische Zeitung* **140**, 1225–1230 (1995).
4. Friedrich, Ch.; Apotheker als Buchautoren. *Deutsche Apotheker-Zeitung* **151**, 6042–6049 (2011).
5. Friedrich, Ch.; Zur gesellschaftlichen Stellung des Apothekers in Deutschland zwischen 1800 und 1870. *Pharmazie* **46** 287–289 (1991).
6. Friedrich, Ch.; Forscher, Künstler, Unternehmer. *Apothekerkarrieren aus vier Jahrhunderten*; Eschborn 2012, p. 91–97.
7. Müller, A. W.; Ludwig Bechstein. In den Hauptzügen seines Lebens und Sterbens gezeichnet. *Handschriftliches Manuskript o. J. Goethe und Schiller-Archiv Weimar*, p. 14.
8. Friedrich, Ch. Theodor Fontane: „Denn wie er zuletzt war, so war er eigentlich“. *Pharmazeutische Zeitung* **143**, 3093–3100 (1998).

9. Lauterbach, I.: Friedrich Witte (1829–1893). Apotheker, pharmazeutischer Unternehmer und Reichstagsabgeordneter unter Berücksichtigung seiner Tagebücher. Stuttgart 2011 (Veröffentlichungen zur Pharmaziegeschichte, 9).
10. Friedrich, Ch. Apothekerliches in Fontanes Romanfragment „Allerlei Glück“. *Geschichte der Pharmazie* **44**, 49–53 (1992).
11. Friedrich, Ch.; Die Apotheke von innen gesehen. Apotheker autobiographien aus zwei Jahrhunderten. Eschborn 1995, p. 103–107.
12. Sudermann, H.: *Das Bilderbuch meiner Jugend*. Stuttgart/Berlin 1922, p. 135
13. Wright, J. (Ed.); *Collected Poems*. Middletown 1995, p. 100.; Georg Trakl: *Gedichte. Dramenfragmente. Briefe*. Bd. 2. Leipzig 1981, p. 52.]
14. Friedrich, Ch. Georg Trakl. Unglücklicher Apotheker und Poet. (Georg Trakl. Unfortunate Pharmacist and Poet.) In: *Pharmazeutische Zeitung* **157**, 358–360 (2012).
15. Ziegenspeck, H.; Bischoff, Gottlieb Wilhelm. In: *Neue Deutsche Biographie*. Bd. 2. Berlin 1955, p. 263.
16. Hein, W.-H.; Baedeker, Friedrich Wilhelm Justus. In: *Deutsche Apotheker-Biographie*. Bd. 1. Stuttgart 1975, p. 21f.
17. Goos, B.; *Erinnerungen aus meiner Jugend*. Hamburg 1896.
18. Friedrich, Ch.; Die Apotheke von innen gesehen. Apotheker autobiographien aus zwei Jahrhunderten. Eschborn 1995, p. 57–65.
19. Hein, W.-H.; Spitzweg, Carl. *Deutsche Apotheker-Biographie*. Bd. 2. Stuttgart 1978, p. 646f.
20. Springer, M.; Johann Andreas Buchner. *Sein Leben und Werk, Ein Beitrag zur Entwicklung der deutschen Hochschulpharmazie im 19. Jahrhundert*. Diss. rer. nat. Marburg 1978.
21. Habrich, Ch.; Carl Spitzweg und die Naturwissenschaften. Nachklänge zu Bildern einer Ausstellung. In: Meyer, K. (Ed.); *Die Schelenz-Stiftung IV. 1989–2003*. Stuttgart 2004, p. 127–165.
22. Friedrich, Ch. Vorhang auf für musizierende Apotheker. *Pharmazeutische Zeitung* **145**, 3995–4002 (2000).

Estudio de asociación epigenómica en la pérdida de peso tras una intervención nutricional: Estudio RESMENA

María Luisa Mansego, Marian Zulet, Javier Campión J, Fermín Milagro F, José Alfredo Martínez*

CIBER CB06/03 Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, (CIBEROBN), Instituto de salud Carlos III, Madrid, España y Centro de Investigación en Nutrición y Departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología, Universidad de Navarra. C/ Irunlarrea 1, Pamplona, Navarra 31008, España

*e-mail: jalfmtz@unav.es

Recibido el 8 de abril de 2014

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 3 (2014), pag.614-623

RESUMEN

Mediante una aproximación epigenómica, se analizaron las posibles asociaciones entre los niveles basales en la metilación del ADN y una mejor respuesta a la pérdida de peso después de un programa de intervención nutricional en la población obesa del estudio RESMENA. Esta investigación ha identificado 3 regiones de ADN (genes *RGS6*, *A2BP1* y *RASGRF1*) que se encuentran diferencialmente metiladas entre sujetos con alta y baja respuesta a la pérdida de peso. Además, estos genes están implicados en la misma ruta metabólica y habían sido previamente significativamente asociados con la obesidad.

Palabras clave: Metilación del ADN; intervención nutricional; pérdida de peso.

ABSTRACT

Epigenomic association study in weight loss after a nutritional intervention: RESMENA Study

Through an epigenomics approach, the possible association between baseline levels in DNA methylation and a better weight loss response after a multidisciplinary intervention program were analyzed in obese population from RESMENA-S study. Three DNA regions that are differentially methylated (*RGS6*, *A2BP1* and *RASGRF1* genes) showed differential methylation levels at baseline between high and low responders to the multidisciplinary weight loss intervention. Moreover, these genes were implicated in the same metabolic pathway and have been previously significantly associated with obesity.

Keywords: DNA methylation; nutritional intervention; weight loss.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad está considerada como uno de los principales problemas de salud en la mayoría de los países por su creciente incidencia en la población y por los trastornos fisiopatológicos asociados (7). La obesidad común es el resultado de la interacción entre factores ambientales y de comportamiento, como la dieta y el ejercicio, con componentes genéticos específicos de cada individuo (17). Así, la predisposición genética es un elemento importante en el desarrollo de obesidad, por lo que las variaciones genotípicas en determinados nucleótidos (SNPs) relacionados con la obesidad son, sin duda, de gran relevancia en dicha susceptibilidad (5). Por otra parte, los procesos epigenéticos tienen un papel clave en la regulación de la expresión génica, modulando así la predisposición génica dependiente de la secuencia de nucleótidos. En este sentido, diversas investigaciones han revelado que diversos mecanismos epigenéticos durante las etapas perinatales (intrauterina, lactancia,...), como el estrés o la dieta materna, están implicados en el desarrollo posterior de obesidad y que, asimismo, la dieta y otros factores ambientales que tienen lugar durante la etapa adulta también pueden influir en la acumulación de grasa a través de mecanismos epigenéticos (3). Incluso, algunas de dichas modificaciones epigenéticas parecen ser transmitidas a la siguiente generación a través de los gametos, por lo que son un serio candidato a explicar una parte del imparable incremento de la prevalencia de obesidad entre niños y adolescentes (21). De hecho, diversos estudios apuntan hacia la importancia de las diferencias epigenéticas entre los diferentes individuos con mayor o menor susceptibilidad al desarrollo de obesidad y otras comorbilidades asociadas o a la facilidad para la pérdida de peso o su mantenimiento posterior (2, 18).

Los principales procesos epigenéticos que podrían influir en el desarrollo de obesidad, debido a su papel en la regulación de la expresión de genes relacionados con ella, son la metilación del ADN en las islas CpG, las modificaciones covalentes en las colas de las histonas por metilación, acetilación o ubiquitinación, y las proteínas reguladoras que mantienen la cromatina en un estado activo (trithorax) o silencioso (polycombs) (6). Algunos autores incluyen también los microRNAs (miRNA) como elementos de regulación epigenética, bien por controlar la expresión de importantes genes reguladores de la epigenética como las acetilasas de histonas o las DNA metiltransferasas, como por el control epigenético de la expresión de ciertos miRNAs(23).

Algunas alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad, como la hiperglucemia y la resistencia a la insulina, así como la presencia de factores prometilantes en la dieta, como el ácido fólico o la metionina, parecen influir de manera decisiva sobre los procesos epigenéticos que afectan a genes relacionados con la obesidad (4). Además, estos mecanismos epigenéticos están influenciados

por otros factores habitualmente asociados a la obesidad, incluyendo la inflamación, a través de la acción de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL-6 (27), el estrés oxidativo (9) y las condiciones de hipoxia que se desarrollan en el tejido adiposo obeso (26). Todas estas modificaciones pueden ser afectadas por diversos fenómenos ambientales, incluyendo numerosos factores dietéticos, y se ha sugerido que se podrían transmitir por un tipo de herencia epigenética transgeneracional (20). En este sentido, un estudio preliminar (19) ha vinculado la obesidad en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa durante la edad adulta con una mayor metilación del promotor de la leptina. Asimismo, se ha comprobado que dicha dieta es capaz de alterar la metilación de genes tan importantes como la ácido graso sintasa (FAS) o el gen mitocondrial NDUF6(15).

Por lo tanto, nuestro objetivo fue investigar los posibles cambios en los patrones de metilación de ADN entre los individuos que mostraron una alta o baja respuesta a un programa integral de pérdida de peso en obesos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio y diseño experimental

El estudio de la reducción del síndrome metabólico en Navarra-España (RESMENA-S) es una estrategia multidisciplinar basada en la crononutrición y la educación nutricional, junto con control dietético y psicológico, que consistió en un ensayo aleatorizado de diseño paralelo y prospectivo en el que participaron un total de 100 individuos. (28). El grupo RESMENA-S (n = 50) siguió una dieta personalizada de pérdida de peso (restricción energética 30%), con una distribución en macronutrientes (hidratos de carbono/grasas/ proteínas) de 40/30/30, elevada frecuencia de ingestas (7/día), bajo índice/ carga glucémica y elevada capacidad antioxidante y adherencia a la dieta Mediterránea (28). El grupo control (n = 50) siguió una dieta con la misma restricción energética y basada en la Asociación Americana del Corazón (AHA). El estudio tuvo una duración de 8 semanas bajo control dietético y psicológico en ambos grupos. Durante un periodo adicional de 16 semanas de auto-control, los voluntarios siguieron el mismo patrón dietético pero sin ningún asesoramiento específico.

El estudio de los niveles de metilación se llevó a cabo en una submuestra de 46 sujetos obesos (50% varones). Estos participantes fueron seleccionados de la muestra de población general y eran los que tuvieron una mejor o peor respuesta a la intervención de pérdida de peso. Se les consideró como "alta respuesta" (perder más de un 5% de su peso inicial al cabo de 24 semanas de intervención; n=26) y "baja respuesta" (aquellos que no lograron una pérdida de su peso del 5%; n=17), respectivamente.

Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito (<http://www.clinicaltrials.gov>; NCT01087086), el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Navarra (065/2009) y estuvo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (revisada en Corea del Sur en 2008).

Evaluaciones antropométricas y bioquímicas

Las medidas antropométricas (peso, talla, circunferencia de cintura y cadera) se llevaron a cabo con los sujetos en ropa interior. El peso corporal se midió con una precisión de 0,1 kg con una Tanita SC-330, (Tanita Corp, Japón). La talla se estimó con un tallímetro (Seca 713 modelo, Postfach, Alemania) con una precisión de 1 mm. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el peso corporal dividido por la altura al cuadrado (kg/m^2). Las circunferencias de la cintura y la cadera se midieron siguiendo protocolos validados (28). La grasa corporal total se midió por impedancia bioeléctrica Tanita SC-330 (TanitaCorp, Japón) y por absorciometría con rayos X de doble energía (DXA) (Prodigy, versión de software 6,0, Madison, WI) como se describió previamente(28).

Las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad-colesterol (HDL-c) y triglicéridos se midieron en un autoanalizador Pentra C-200 (HORIBA ABX, Madrid, España) con los kits específicos. Las concentraciones de insulina se determinaron mediante un kit de ensayo inmunoenzimático (Mercodia, Uppsala, Suecia) en un autoanalizador Triturus (Grifols SA, Barcelona, España).

Extracción de ADN

Muestras de sangre venosa se recogieron al inicio del estudio para la obtención de ADN. El ADN genómico fue extraído utilizando el kit de purificación de ADN *Master Purefor Blood Version II* (Biotecnologías Epicenter, Madison, WI, EE.UU.) y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

Determinación de patrones de metilación de ADN

El perfil epigenético del ADN genómico fue analizado en 48 individuos seleccionados del estudio RESMENA-S utilizando el ensayo de metilación Human Methylation 450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA) conteniendo más de 485.000 sitios CpGs individuales. Brevemente, 500 ng de ADN genómico tratado con bisulfito sódico (EZ DNA Methylation™ Kit; Epiect, Qiagen) fue amplificado, marcado, hibridado con sondas metiladas y no metiladas y escaneado de los microarrays en la plataforma HiScanSQ de Illumina, Inc. El análisis de imagen y determinación de la señal de las sondas se realizó usando el software Genome Studio, Módulo de metilación (Illumina, Inc).

Los datos de metilación en un sitio CpG concreto se obtuvieron a partir de las intensidades de señal para la sonda metilada (M) y la no metilada (U) para ADN genómico en esa posición. Así, los nivel de metilación (β) fueron calculados como la

proporción de metilado respecto al total de la señal [i.e., $\beta = M/(M + U)$], donde el rango β oscila desde 0 (no metilado) a 1 (metilado).

El análisis de las rutas metabólicas se realizó con el uso de Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems, Inc., Redwood City, CA, EE.UU.; <http://www.ingenuity.com>), que incluye datos de forma manual precisos y trazables totalmente derivados de fuentes bibliográficas.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). La prueba de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks se utilizaron para determinar la normalidad en la distribución variable.

Las diferencias en los parámetros clínicos y antropométricos tras la intervención entre respondedores altos y bajos a la dieta fueron evaluadas con la prueba t-Student o la U de Mann Whitney. El gráfico de volcán y la diferencia entre los distintos sitios CpGs fueron evaluados por ANOVA de una vía (respuesta al efecto de la dieta ajustado por edad y efecto del uso de distintos microarrays) gracias al programa Array Studio 5.0 (Omicsoft, Cary, NC, USA). Se aplicó la tasa de falso descubrimiento (False DiscoverRate; FDR) en los ajustes por comparaciones múltiples.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente proyecto se ha centrado en la selección de los individuos que participaron en el estudio RESMENA-S hasta el final del mismo. Las características generales de los participantes agrupados en función de su respuesta a la intervención dietética, no difirieron significativamente entre los sujetos del grupo control y RESMENA-S en variables antropométricas, presión arterial y perfil lipídico (Tabla 1). Sin embargo, los individuos con una alta respuesta a la dieta mostraron una reducción significativa en la mayoría de los parámetros antropométricos con respecto a sus valores iniciales de los mismos.

Con respecto a los resultados obtenidos en el microarray Human Methylation450 BeadChip, tras analizar los controles de calidad de dicho array se redujo la muestra a 46 sujetos analizados. El gráfico de volcán mostró la distribución de los 485512 sitios CpG analizados con respecto a la respuesta frente a la pérdida de peso debida a la dieta (Figura 1). El estudio de microarray mostró 90 sitios CpG diferencialmente metilados (P-valor <0,01) entre sujetos con alta respuesta a la dieta frente a los que presentaron una baja respuesta a la intervención nutricional. Ninguno de estos CpG fue estadísticamente significativo tras los ajustes por comparaciones múltiples aplicando FDR. Cuarenta de estos sitios se encontraron hipometilados y cincuenta hipermetilados en el grupo de los sujetos con baja respuesta comparado con los que mostraron alta respuesta a la

perdida de peso. Las características de los 10 principales genes asociados independientemente con la respuesta a la dieta (Tabla 2).

Tabla 1.- Características clínicas de 46 obesos en situación basal y tras 24 semanas de intervención dietética de la población RESMENA-S.

Variables	Alta respuesta (N=28)		Baja respuesta (N=20)	
	Basal	Después de 24 semanas	Basal	Después de 24 semanas
Sexo (N mujeres, %)	14 (48,9)		9 (47,9)	
Edad (años)	49,9 (10,6)		45,6 (8,2)	
Tipo de dieta (N control(%))	11 (41,4)		9 (47,9)	
Peso (kg)	100,9 (17,6)	90,0 (18,6) *	105,2 (18,2)	108,0 (17,5)
IMC (kg/m ²)	35,9 (4,8)	31,9 (4,9) **	36,9 (1,9)	35,9 (2,0)
Cintura (cm)	110,9 (13,3)	101,3 (14,9) *	114,8 (11,9)	114,9 (9,2)
Cadera (cm)	116,2 (9,3)	109,1 (9,4) **	118,9 (7,1)	116,7 (7,9)
Índice CC	1,0 (0,1)	0,9 (0,1)	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)
PAS (mmHg)	151,3 (18,1)	131,2 (13,6)**	145,9 (16,2)	140,3 (14,3)
PAD (mmHg)	85,3 (9,8)	75,8 (10,0) **	85,6 (6,4)	81,9 (11,4)
Masa grasa (%)	38,1 (8,1)	33,2 (8,0) *	41,2 (5,5)	37,1 (6,2)
Glucosa (mg/dl)	117,2 (28,1)	104,0 (16,2) *	133,4 (43,7)	128,3 (34,0)
CT (mg/dl)	221,2 (51,1)	213,1 (41,1)	216,3 (50,3)	215,2 (52,7)
HDLc (mg/dl)	44,2 (10,1)	47,6 (11,2)	41,2 (11,5)	47,3 (15,5)
TG (mg/dl)	178,5 (86,5)	123,4 (41,9)*	220,6 (142,3)	229,3 (163,3)
Insulina (mUI)	13,1 (7,5)	6,3 (3,8) **	18,9 (11,3)	16,0 (10,6)

Media (Desviación estándar). IMC: Índice de Masa Corporal; Índice CC: Índice cintura/cadera; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; CT: Colesterol total; HDLc: lipoproteínas de alta densidad-colesterol; TG: Triglicéridos. *P-valor <0.05, **P-valor <0,001 frente a los valores basales.

Con respecto a los resultados de IPA sobre rutas metabólicas implicadas para estos 90 sitios CpGs diferencialmente metilados entre los sujetos con alta y baja respuesta tras la intervención, se identificaron redes relacionadas con el cáncer, las enfermedades del sistema reproductivo y la respuesta inflamatoria, ciclo celular, lesiones organismo, y las anomalías y cáncer, y el movimiento celular,

el tráfico de célula inmune, desarrollo y función del sistema hematológico que participan en la respuesta de la pérdida de peso (Figura 2).

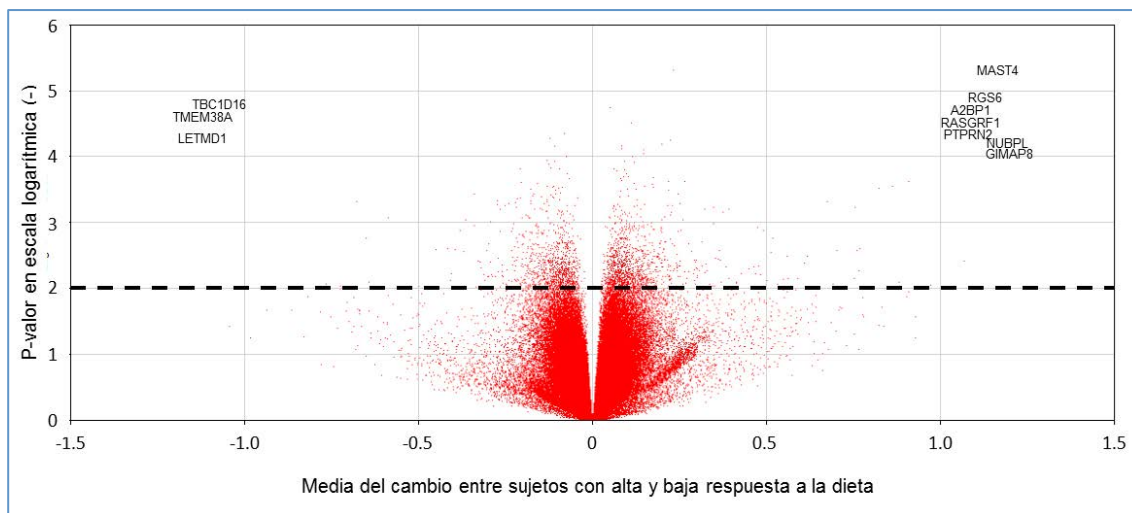


Figura 1.- Gráfico tipo volcán de la asociación de metilación ajustado por edad y sexo (N=43) La línea discontinua muestra los genes con niveles de metilación significativamente diferenciados entre sujetos con alta y baja respuesta a la dieta (p-valor < 0.01).

Tabla 2.-Características genéticas de los 10 CpGs con mayor asociación a la respuesta dietética ajustados por edad y sexo en 43 individuos.

Gen	ID Illumina	Cr	Posición CpG	Media de cambio	P-valor
MAST4	cg01933079	5	65929713	1.174	5.02E-06
RGS6	cg10741333	14	72400168	1.0797	3.07E-05
TBC1D16	cg16775460	17	77984481	-1.0581	4.41E-05
TMEM38A	cg04172000	19	16771088	-1.0879	5.34E-05
A2BP1	cg01050225	16	7703947	1.1481	6.34E-05
RASGRF1	cg15156078	15	79383413	1.0601	6.86E-05
LETMD1	cg01016169	12	51441443	-1.0777	6.93E-05
PTPRN2	cg25029446	7	157495282	1.0594	7.70E-05
NUBPL	cg22905571	14	32269554	1.1076	7.90E-05
GIMAP8	cg01364581	7	150175800	1.108	8.80E-05

ID:Identificador, Cr: cromosoma. Version 37.

El reciente concepto "nutrición personalizada" asociado a los campos de la genómica, la proteómica y la metabolómica está surgiendo con fuerza en los últimos tiempos (16). En ese sentido, los estudios genómicos se están dirigiendo hacia la prevención de la obesidad basándose en dietas personalizadas (22). En consecuencia, los marcadores genéticos y epigenéticos han sido considerados como herramientas de predicción para evaluar las diferencias individuales en la capacidad de respuesta después de una intervención nutricional (12). Nuestro análisis reveló que el patrón de la metilación epigenética diferencial entre sujetos con alta y baja respuesta a un programa de pérdida de peso multidisciplinario podría ayudar a predecir la disminución de peso en obesos adultos.

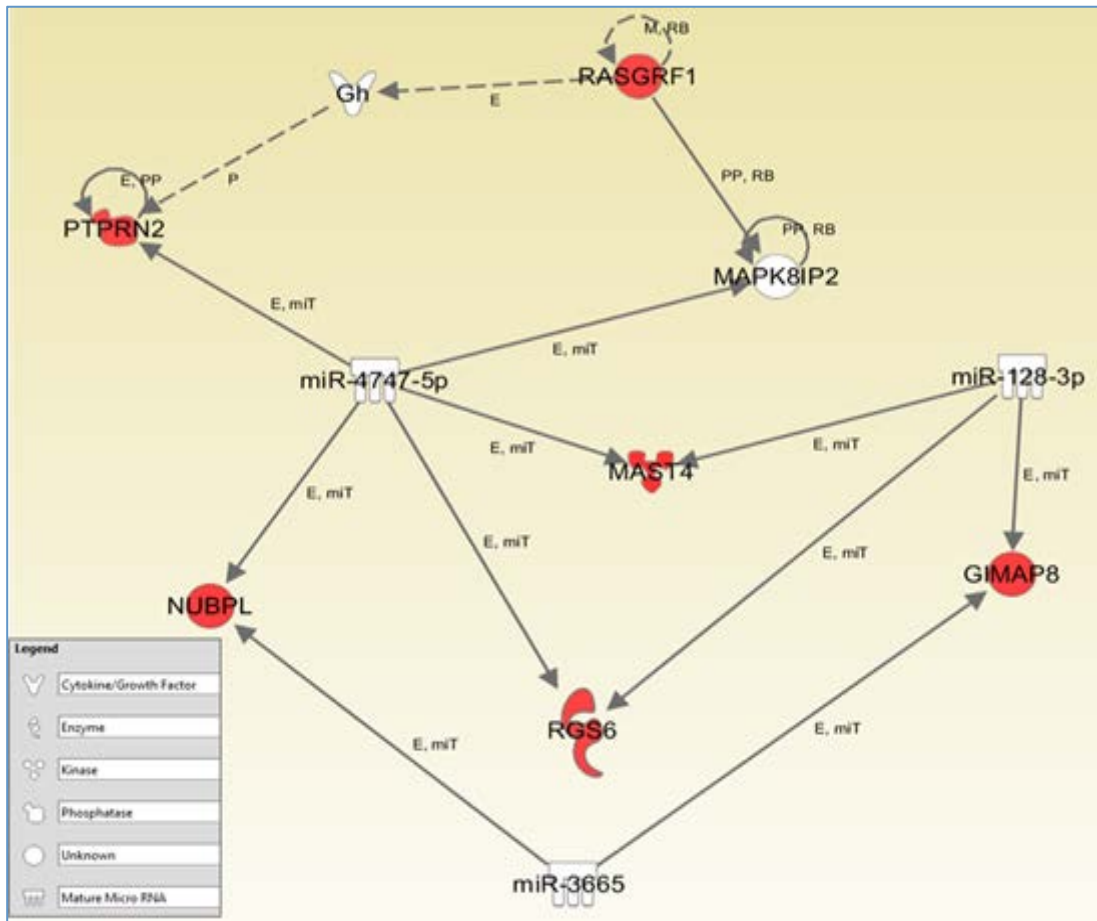


Figura 2.- Ruta metabólica cuyas funciones principales son la señalización y morfología celular y compuesta por 6 de los genes con mayor asociación a la respuesta de la dieta (*RGS6*, *PTPRN2*, *MAST4*, *RASGRF1*, *GIMAP8*, *NUBPL*).

P: Fosforilación / desfosforilación, E: Expresión (incluye metabolismo / síntesis de productos químicos); M: Modificación bioquímica; miT: Transcripción microARN; PP: unión de proteína-proteína; RB: Regulación de la unión. ----- Interacción indirecta, —————> Actúa sobre la molécula.

Adicionalmente, se han identificado algunos genes con una clara influencia sobre la obesidad como es el caso del gen *A2BP1* (cg01050225), que codifica para la proteína 1 de unión a ataxina-2 (también conocido como Fox-1) y puede estar implicado en transcripción alternativa de tejidos específicos (11). Además, este gen contiene motivos de unión a ARN, *A2BP1* también interactúa con la ataxina-2 (*ATXN2*) (24), una proteína que parece ser que participan en el metabolismo de ARN (14). *ATXN2* ha sido relacionada en la enfermedad neurodegenerativa, ataxia espinocerebelosa tipo 2 (*SCA2*) (14), y la hiperfagia y la obesidad son dos características clínicas principales en *SCA2* (1). Consistente con esta observación, se ha descrito como ratones knockout para *ATXN2* (*Sca/-*) presentan mayores valores de IMC que ratón tipo salvaje para este gen cuando ambos son alimentados con una dieta alta en grasas (10, 13).

Otro de los genes asociados a la respuesta dietética es el *RGS6* que a su vez se ha descrito como gen candidato para el estudio de la adiposidad, ya que pueden

estar asociados con una tendencia conductual hacia el consumo de alimentos cargado de grasa (25).

Por último, una asociación entre la metilación génica del gen *RASGRF1* al inicio del estudio y los cambios antropométricos después de la intervención. Los sujetos que respondieron eficazmente al tratamiento mostraron porcentajes de metilación significativamente más altos después del tratamiento. *RASGRF1* está implicado en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa mediante la regulación de las células beta pancreáticas (8). Ratones knock-out para el gen *RASGRF1* muestran un fenotipo similar a las manifestaciones de tipo 2 de diabetes preclínica (8).

En resumen, este trabajo describe un patrón epigenético diferencial en sujetos de la población RESMENAS que podría ser aplicado para predecir cambios de peso corporal. También se ha identificado 90 regiones de ADN diferencialmente metiladas, dependiendo de la respuesta de la pérdida de peso. Estos cambios epigenéticos pueden ayudar a entender y predecir mejor la respuesta para perder peso.

4. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por Línea Especial sobre Nutrición, Obesidad y Salud (Universidad de Navarra LE/97), la fundación Mapfre y CIBER CB06/03 Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, (CIBEROBN), Instituto de salud Carlos III. A M.L.M. se le fue concedida una beca Juan de la Cierva del Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno de España.

5. REFERENCIAS

1. Abdel-Aleem, A; Zaki, MS. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) in an Egyptian family presenting with polyphagia and marked CAG expansion in infancy. *J Neurol* 255, 413-419(2008).
2. Bouchard, L; Rabasa-Lhoret, R; Faraj, M; Lavoie, ME; Mill, J; Perusse, L; Vohl, MC. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr* 91, 309-320(2010).
3. Champion, J; Milagro, F; Martinez, JA. Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 94, 291-347(2010).
4. Champion, J; Milagro, FI; Martinez, JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 10, 383-392(2009).
5. Chagnon, YC; Rankinen, T; Snyder, EE; Weisnagel, SJ; Perusse, L; Bouchard, C. The human obesity gene map: the 2002 update. *Obes Res* 11, 313-367(2003).
6. Dolinoy, DC; Jirtle, RL. Environmental epigenomics in human health and disease. *Environ Mol Mutagen* 49, 4-8(2008).
7. Finucane, MM; Stevens, GA; Cowan, MJ; Danaei, G; Lin, JK; Paciorek, CJ; Singh, GM; Gutierrez, HR; Lu, Y; Bahalim, AN; Farzadfar, F; Riley, LM; Ezzati, M. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377, 557-567(2011).

8. Font de Mora, J; Esteban, LM; Burks, DJ; Nunez, A; Garces, C; Garcia-Barrado, MJ; Iglesias-Osma, MC; Moratinos, J; Ward, JM; Santos, E. Ras-GRF1 signaling is required for normal beta-cell development and glucose homeostasis. *EMBO J* 22, 3039-3049(2003).
9. Hitchler, MJ; Domann, FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 43; 1023-1036(2007).
10. Kiehl, TR; Nechiporuk, A; Figueroa, KP; Keating, MT; Huynh, DP; Pulst, SM. Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 17-24(2006).
11. Kuroyanagi, H. Fox-1 family of RNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 66, 3895-3907(2009).
12. Kussmann, M; Krause, L; Siffert, W. Nutrigenomics: where are we with genetic and epigenetic markers for disposition and susceptibility? *Nutr Rev* 68 Suppl 1, S38-47(2010).
13. Lastres-Becker, I; Brodessa, S; Lutjohann, D; Azizov, M; Buchmann, J; Hintermann, E; Sandhoff, K; Schurmann, A; Nowock, J; Auburger, G. Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice. *Hum Mol Genet* 17, 1465-1481(2008).
14. Lastres-Becker, I; Rub, U; Auburger, G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum* 7, 115-124 (2008).
15. Lomba, A; Martinez, JA; Garcia-Diaz, DF; Paternain, L; Marti, A; Campion, J; Milagro, FI. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a nutriepigenetic study on FASN and NDUFB6 gene promoters. *Mol Genet Metab* 101, 273-278(2010).
16. Marti, A; Goyenechea, E; Martinez, JA. Nutrigenetics: a tool to provide personalized nutritional therapy to the obese. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 3, 157-169 (2010).
17. Martinez, JA; Parra, MD; Santos, JL; Moreno-Aliaga, MJ; Marti, A; Martinez-Gonzalez, MA. Genotype-dependent response to energy-restricted diets in obese subjects: towards personalized nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 17 Suppl 1, 119-122(2008).
18. Milagro, FI; Campion, J; Cordero, P; Goyenechea, E; Gomez-Uriz, AM; Abete, I; Zulet, MA; Martinez, JA. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J* 25, 1378-1389 (2011).
19. Milagro, FI; Campion, J; Garcia-Diaz, DF; Goyenechea, E; Paternain, L; Martinez, JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 65, 1-9(2009).
20. Ng, SF; Lin, RC; Laybutt, DR; Barres, R; Owens, JA; Morris, MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467, 963-966 (2010).
21. Orsi, CM; Hale, DE; Lynch, JL. Pediatric obesity epidemiology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18, 14-22 (2011).
22. Razquin, C; Marti, A; Martinez, JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARgamma. Approaches for personalized nutrition. *Mol Nutr Food Res* 55, 136-149(2011).
23. Sato, F; Tsuchiya, S; Meltzer, SJ; Shimizu, K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 278, 1598-1609 (2011).
24. Shibata, H; Huynh, DP; Pulst, SM. A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. *Hum Mol Genet* 9, 1303-1313 (2000).
25. Sibbel, SP; Talbert, ME; Bowden, DW; Haffner, SM; Taylor, KD; Chen, YD; Wagenknecht, LE; Langefeld, CD; Norris, JM. RGS6 variants are associated with dietary fat intake in Hispanics: the IRAS Family Study. *Obesity (Silver Spring)* 19, 1433-1438(2011).
26. Watson, JA; Watson, CJ; McCann, A; Baugh, J. Epigenetics, the epicenter of the hypoxic response. *Epigenetics* 5, 293-296 (2010).
27. Wierda, RJ; Geutskens, SB; Jukema, JW; Quax, PH; van den Elsen, PJ. Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. *J Cell Mol Med* 14, 1225-1240(2010).
28. Zulet, MA; Bondia-Pons, I; Abete, I; de la Iglesia, R; Lopez-Legarrea, P; Forga, L; Navas-Carretero, S; Martinez, JA. The reduction of the metabolic syndrome in Navarra-Spain (RESMENA-S) study: a multidisciplinary strategy based on chrononutrition and nutritional education, together with dietetic and psychological control. *Nutr Hosp* 26, 16-26 (2011).

Un postre lácteo con un perfil lipídico modificado modula los niveles posprandiales de ApoB y puede promover la sensibilidad a la insulina en adultos sanos

Almudena Aguado-Barrios^{1†}, Santiago Navas-Carretero^{1,2†}, M. Ángeles Zulet^{1,2}, J. Alfredo Martínez^{1,2*}

¹Departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología. Universidad de Navarra. c/ Irunlarrea, 1. 31008, Pamplona, España. ²CIBERobn, Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. †Ambos autores contribuyen igualmente.

*e-mail: jalfmtz@unav.es

Recibido el 9 de abril de 2014

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 3 (2014), pag.624-636

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue estudiar en adultos sanos los efectos de una cuajada con perfil lipídico modificado sobre marcadores de riesgo cardiovascular. El estudio consistió en una intervención nutricional posprandial, doble ciego, aleatorizada, en 20 adultos sanos. En cada visita los participantes consumían la cuajada asignada y se obtuvieron muestras de sangre basales y durante 6 horas, para analizar variables relacionadas con riesgo cardiovascular. Los niveles posprandiales de Apolipoproteína-B fueron significativamente inferiores ($p=0.008$), mientras que los valores de colesterol total y LDL-colesterol también se redujeron modestamente (ns), observándose una tendencia ($p<0.10$) a mejorar la sensibilidad a la insulina tras consumir la cuajada experimental frente al control. Estos resultados permiten atribuir un posible efecto beneficioso sobre la salud, asociado al consumo de un postre con perfil lipídico modificado.

Palabras clave: Cuajada; intervención posprandial; enfermedad cardiovascular.

ABSTRACT

A dairy dessert with a modified lipid profile modulates postprandial apob levels and may influence insulin sensitivity in healthy adults

The aim of the present work was to study the effects of a curd with modified lipid profile on postprandial cardiovascular disease markers in healthy subjects. The study was a randomised postprandial, crossover, double-blind nutritional

intervention, with 20 healthy adults. In each visit participants consumed the assigned curd and blood samples were obtained at baseline and during 6h, to analyse cardiovascular risk-related variables. ApoB postprandial levels were significantly lower ($p = 0.008$) while total cholesterol and LDL-cholesterol values were only slightly reduced(ns) and a tendency ($p < 0.10$) to improve insulin sensitivity was also observed after consuming the experimental vs the reference curd. A possible beneficial effect on health can be attributed to the consumption of this dessert with modified lipid profile.

Keywords: Curd; postprandial intervention; cardiovascular disease.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de morbimortalidad en los países desarrollados. El riesgo de desarrollar aterosclerosis y ECV depende de numerosos factores como el estado inflamatorio del sujeto, hiperlipemia en ayunas y posprandial, disfunción endotelial, hipertensión, hiperglicemia, resistencia insulínica, obesidad y estado protrombótico. Muchos de estos factores están interrelacionados con el Síndrome Metabólico (1).

La situación posprandial constituye el estado metabólico habitual en el que se encuentra el ser humano a lo largo del día, que consiste fundamentalmente en el desarrollo de procesos metabólicos tras la ingesta de alimentos (2,3). La lipemia posprandial representa el acúmulo en plasma de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG), tales como quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y sus remanentes (4,5), cuya hidrólisis resulta en la formación de ácidos grasos libres (AGL) y glicerol. La acumulación y el grado de saturación de los AGL son considerados uno de los factores de riesgo para el desarrollo de Síndrome Metabólico (6).

Hay evidencias de la relación entre la hipertrigliceridemia posprandial, la resistencia insulínica y la enfermedad coronaria, siendo probable que los triglicéridos posprandiales sean un mejor predictor de enfermedad coronaria que los triglicéridos en ayunas (6). La hipertrigliceridemia posprandial está relacionada con la obesidad, el sexo, la edad, la diabetes y el estilo de vida (7). Por otro lado, la hipertrigliceridemia posprandial produce una activación de neutrófilos y monocitos y un incremento en la concentración de moléculas proinflamatorias como interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que son citoquinas muy relacionadas con la génesis del Síndrome Metabólico y la resistencia a la insulina (8).

La variabilidad individual de la respuesta lipémica posprandial excede a la que se produce en la lipemia del ayuno, debido a la influencia de factores

ambientales y genéticos. Entre los primeros se incluye el grado de actividad física, el consumo de alcohol y tabaco, el estado hormonal de la mujer y el sexo, siendo el tipo de alimentación habitual de las personas uno de los factores más relevantes (9). En este contexto, la lipemia posprandial está influenciada por factores dietéticos, tanto por la cantidad de grasa ingerida (10), como por el tipo de grasa consumida o calidad de la grasa (6, 11). Las recomendaciones dietéticas para la prevención de ECV en los últimos años (12) han ido dirigidas al reemplazo de los ácidos grasos saturados (AGS) por ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGP). En estudios metabólicos se ha evidenciado que el consumo de AGP y AGM resulta en un perfil lipídico más saludable que tras la ingesta de AGS (12, 13), pero existe también una relativa controversia dado que se han encontrado niveles aumentados (14) y disminuidos (11) de triglicéridos en estudios que comparaban los efectos del consumo de mantequilla (AGS) y ácido linoleico (AGP).

La dieta mediterránea, rica en AGM procedentes de aceite de oliva, ha sido asociada con un menor riesgo de ECV (16, 17). Múltiples ensayos basados en estudios de cohortes han observado que la elevada adherencia a esta dieta está asociada a una mejora en el estado de salud del individuo reduciendo la mortalidad y complicaciones asociadas a ECV y una menor prevalencia de enfermedades crónicas (14, 17). El consumo de AGM procedentes de la dieta favorece un perfil lipídico más saludable, mejora la sensibilidad a la insulina y regula los niveles de presión arterial y de glucosa sérica. Análisis recientes sugieren un posible papel de los AGM de la dieta en la regulación de la composición corporal reduciendo el riesgo de obesidad (18).

La situación posprandial es un período dinámico del metabolismo en el que, a partir de los substratos absorbidos de la dieta, ocurren fenómenos tanto de biosíntesis como de oxidación. Los estudios posprandiales tienen una serie de ventajas, siendo la situación fisiológica más habitual en el sujeto de las sociedades desarrolladas (1). Tras la ingesta, los niveles de glucosa y lípidos plasmáticos aumentan considerablemente hasta alcanzar estados hiperglicémicos e hipertriglicéridémicos, los cuales activan procesos inflamatorios y estrés oxidativo. En este sentido, es interesante el estudio del estado posprandial del individuo para analizar dichos procesos inflamatorios con el fin de prevenir el estrés oxidativo asociado al desarrollo de determinadas enfermedades crónicas. (7, 19-22).

El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto del consumo de un producto lácteo con perfil lipídico modificado (cuajada de leche de oveja) frente a un producto lácteo de perfil lipídico comercial sobre el perfil lipídico y glucémico posprandial y marcadores inflamatorios de hombres y mujeres adultos sanos.

2. SUJETOS Y MÉTODOS

2.1. Sujetos

El estudio enroló a 20 hombres y mujeres adultos sanos mediante la colocación de carteles informativos de reclutamiento en centros públicos de Pamplona previa autorización de dichos centros (polideportivos, centros culturales, etc). Los criterios de inclusión fueron: hombres y mujeres sanos de edades comprendidas entre 20 y 45 años, con normopeso o sobrepeso grado I o II según la clasificación de la SEEDO, con un nivel de colesterol total plasmático < 240 mg/dL y sin enfermedades crónicas relacionadas con alteraciones del metabolismo o que requieran tratamiento farmacológico. Los criterios de exclusión fueron: sujetos con niveles de colesterol total plasmático fuera del rango de la normalidad, con obesidad grado I, II, III o IV; personas que, teniendo valores de colesterol total normales, presenten alguna otra alteración relacionada con un aumento de riesgo cardiovascular; sujetos con medicación concomitante con tratamientos adelgazantes o terapia hormonal sustitutiva, con alergias alimentarias conocidas y mujeres embarazadas, lactantes o menopáusicas.

2.2. Producto del estudio

El producto lácteo a estudio fue una cuajada de leche de oveja cuyos ingredientes principales eran leche de oveja pasteurizada y cuajo. La composición nutricional de ambas cuajadas fue facilitada por la empresa promotora, siendo la única diferencia entre la cuajada control y la experimental la composición de ácidos grasos (Tabla 1). El valor calórico total de ambas cuajadas fue 96 Kcal/100 gr de producto, del cual un 6.2% provenían de las grasas, un 4.5% de proteínas y un 5.5% de carbohidratos (de los cuales 2.8% en forma de azúcares).

2.3. Diseño del estudio

El estudio se planteó como una intervención posprandial, cruzada, doble ciega, con dos ramas: grupo experimental y grupo control. La duración del estudio posprandial fue de 6 horas desde el consumo del producto en estudio, durante las cuales se realizaron extracciones de sangre a los 30 minutos y cada hora después de haber consumido la cuajada hasta los 360 minutos, que se realizaba la última extracción. Los voluntarios acudieron a la Unidad Metabólica del Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología (CAFT) de la Universidad de Navarra en dos ocasiones con, al menos, dos semanas de diferencia y en ayunas de 10-12 horas tras haber consumido la noche anterior una cena protocolizada. En cada visita, los voluntarios llegaron a la Unidad Metabólica, y tras realizarles las correspondientes medidas antropométricas, se insertó una cánula y se realizó la primera extracción de muestra (basal o tiempo 0). A continuación se le proporcionó la cuajada de estudio asignada de manera aleatoria y se le pidió que la consumiera dentro de los 5 minutos siguientes. A los 30 minutos de su ingesta, se

realizó una nueva extracción de sangre y así sucesivamente en los tiempos 60, 120, 180, 240, 300 y 360. Durante las 6 horas que duró el estudio posprandial, los voluntarios únicamente pudieron consumir agua.

Tabla 1.- Diferenciación del perfil de ácidos grasos entre las cuajadas.

	CUAJADA CONTROL	CUAJADA EXPERIMENTAL
Ácido Butírico (C4:0)	2,8	3,2
Ácido Caproico(C6:0)	2,2	2,5
Ácido Caprílico (C8:0)	2,1	2,3
Ácido Cáprico (C10:0)	6,7	6,8
Ácido Láurico (C12:0)	3,7	3,7
Ácido Mirístico (C14:0)	10,7	9,1
Ácido Miristoleico (n-5 C14:1)	0,2	0,2
Ácido Pentadecanoico (C15:0)	0,8	0,8
Ácido Palmítico (C16:0)	31,7	23,1
Ácido Palmitoleico (n-7 C16:1)	1,1	1,2
Ácido Heptadecanoico (C17:0)	0,2	0,6
Ácido Esteárico (C18:0)	9,6	11,5
Ácido Oleico (n-9 C18:1)	23,1	28,7
Ácido Linoleico (n-6 C18:2)	4,1	5,0
Ácido Linolénico (n-3 C18:3)	0,6	0,7
Ácido Araquídico (C20:0)	0,2	0,3
Ácido Gadoleico (n-9 C20:1)	0,1	0,1
Ácido Behénico (C22:0)	0,1	0,2
Ácidos Grasos Saturados	70,8	64,1
Ácidos Grasos Monoinsaturados	24,5	30,2
Ácidos Grasos Poliinsaturados	4,7	5,7

El estudio cumple con las condiciones recomendadas en la Declaración de Helsinki para la investigación con sujetos. El protocolo del proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Navarra (004/2012). Todos los voluntarios participantes en el estudio dieron su consentimiento informado por escrito antes de comenzar el ensayo.

2.4. Métodos analíticos

Las muestras de sangre recogidas tras canulización de una vía, fueron distribuidas en 2 tubos con EDTA de 4 mL (BectonDickinsonVacutainer, Madrid, España) y 1 tubo con gel activador para la obtención de suero (BectonDickinsonVacutainer, Madrid, España) y fueron inmediatamente almacenadas en refrigeración (4°C). A continuación, los tubos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C (EppendorfCentrifuge 5804R, Hamburgo, Alemania) y plasma y suero fueron divididos en alícuotas de 500 µl (tubos eppendorf) y almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

Las concentraciones séricas de colesterol total, c-HDL, triglicéridos, glucosa, homocisteína, ácido úrico y ácidos grasos libres fueron determinadas con

unautoanalizador Pentra-C200 (HORIBA-ABX, Montpellier, Francia) mediante colorimetría y utilizando kits comerciales convencionales. Las concentraciones séricas de Apolipoproteína A (ApoA) y Apolipoproteína B (ApoB) fueron determinadas utilizando técnicas espectrofotométricas en el analizador Hitachi Modular Analytics 911 (Roche Diagnostics, Basle, Suiza) mediante reactivos comerciales. Las concentraciones de insulina, TNF- α y PCR ultrasensible fueron determinadas en plasma mediante un inmunoensayo ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) en el autoanalizador Triturus (GRIFOLS, Barcelona, España) utilizando kits de reactivos comerciales. La concentración de LDL-c se determinó mediante la fórmula de Friedewald (23) a partir de los valores de colesterol total, c-HDL y triglicéridos. Los valores del índice HOMA se obtuvieron a partir de la glucosa y la insulina aplicando la fórmula propuesta por Mathews y col en 1995 (24).

2.5. Análisis estadístico

En este estudio, cada sujeto consumió ambos productos, la cuajada experimental y la control.

Las variables analizadas se ajustaban a la normalidad, por lo que se presentan como media y desviación estándar. Los valores basales se han analizado mediante test de la t de Student para detectar diferencias significativas en las medidas antropométricas entre la visita de consumo de la cuajada experimental y la visita de consumo de la cuajada control antes de ingerir los productos. Los valores de PCR ultrasensible de 3 sujetos fueron excluidos del estudio debido a un aumento clínicamente relevante entre los días de visita, reflejo de algún probable proceso infeccioso y/o inflamatorio.

Las diferencias entre productos en las variables se han evaluado mediante un análisis de varianza de medidas repetidas, teniendo como factores o variables independientes el tipo de cuajada (A o B) y el tiempo (0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 minutos) así como la interacción entre el tipo de cuajada y el tiempo.

También se ha realizado un estudio de las áreas bajo la curva calculadas mediante el software Graph Pad Prism 5.0 para Windows (Graph Pad Software, Inc., EEUU) mediante análisis de la t de Student. El tratamiento estadístico de los datos se ha realizado con el paquete informático SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., EEUU).

3. RESULTADOS

3.1. Características basales

Las características basales antropométricas y clínicas de los sujetos participantes en el estudio se muestran en la Tabla 2. Como era de esperar, no se

obtuvieron cambios significativos en dichos parámetros entre ambas visitas que pudieran influir en los resultados.

Tabla 2.- Características basales de los participantes al consumir ambas cuajadas.

<i>Variables</i>	<i>Cuajada control</i>	<i>Cuajada experimental</i>
Sujetos (n)	20	20
IMC (Kg/m ²)	22,5 ± 2,5	22,6 ± 2,5
Colesterol total (mg/dL)	190 ± 32	187 ± 31
c-HDL (mg/dL)	66 ± 11	66 ± 12
c-LDL (mg/dL)	107 ± 27	101 ± 30
Triglicéridos (mg/dL)	85 ± 31	86 ± 31
Apolipoproteína A (mg/dL)	161 ± 25	166 ± 26
Apolipoproteína B (mg/dL)	66 ± 22	66 ± 23
Glucosa (mg/dL)	79,5 ± 6,8	80,4 ± 5,6
Insulina (μU/mL)	5,5 ± 2,9	4,8 ± 2,6
HOMA-IR	1,11 ± 0,68	0,96 ± 0,54
Ácidos grasos libres (mmol/L)	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,2
Homocisteína (μmol/L)	12,8 ± 8,4	11,8 ± 7,2
Ácido úrico (mg/dL)	4,8 ± 1,2	4,9 ± 1,2
TNF-α (pg/mL)	0,92 ± 0,52	0,89 ± 0,51
PCR (μg/mL)	1,3 ± 1,5	1,3 ± 1,9

3.2. Lipemia posprandial

La ingesta de la cuajada experimental no presentó diferencias significativas con la cuajada control sobre la evolución posprandial del colesterol total, c-HDL, c-LDL, Triglicéridos y Apo A (Figura 1). En relación a la Apo B (Figura 1, p= 0,008), considerada la variable principal del estudio, la determinación de las concentraciones plasmáticas mostró diferencias significativas en cuanto al efecto de la interacción de cada tipo de cuajada con el tiempo. Para todas las variables medidas, sí existe un efecto del tiempo (p<0,05) sobre ellas, independientemente del tipo de cuajada consumida.

3.3. Metabolismo glucídico posprandial

La evolución posprandial de los biomarcadores del metabolismo glucídico estudiados: glucosa, insulina, índice de resistencia a la insulina HOMA-IR y ácidos grasos libres no permitió detectar diferencias significativas entre el efecto de la cuajada experimental y la cuajada control (Figura 2). Los niveles de insulina aumentaron a los 30 minutos de la ingesta de ambos tipos de cuajada (17,38±9,14 tras cuajada experimental, 18,97±10,66 tras cuajada control), hecho que no fue acompañado de un aumento en los niveles de glucosa. Las áreas bajo la curva de

insulina y HOMA tras el consumo de la cuajada experimental mostraron una tendencia positiva, que parecen indicar que dicha cuajada podría aumentar marginalmente ($p < 0,10$) la sensibilidad a la insulina en comparación con la cuajada control (Tabla 3), encontrando también un efecto significativo del tiempo sobre cada una de las variables dependientes estudiadas ($p < 0,05$).

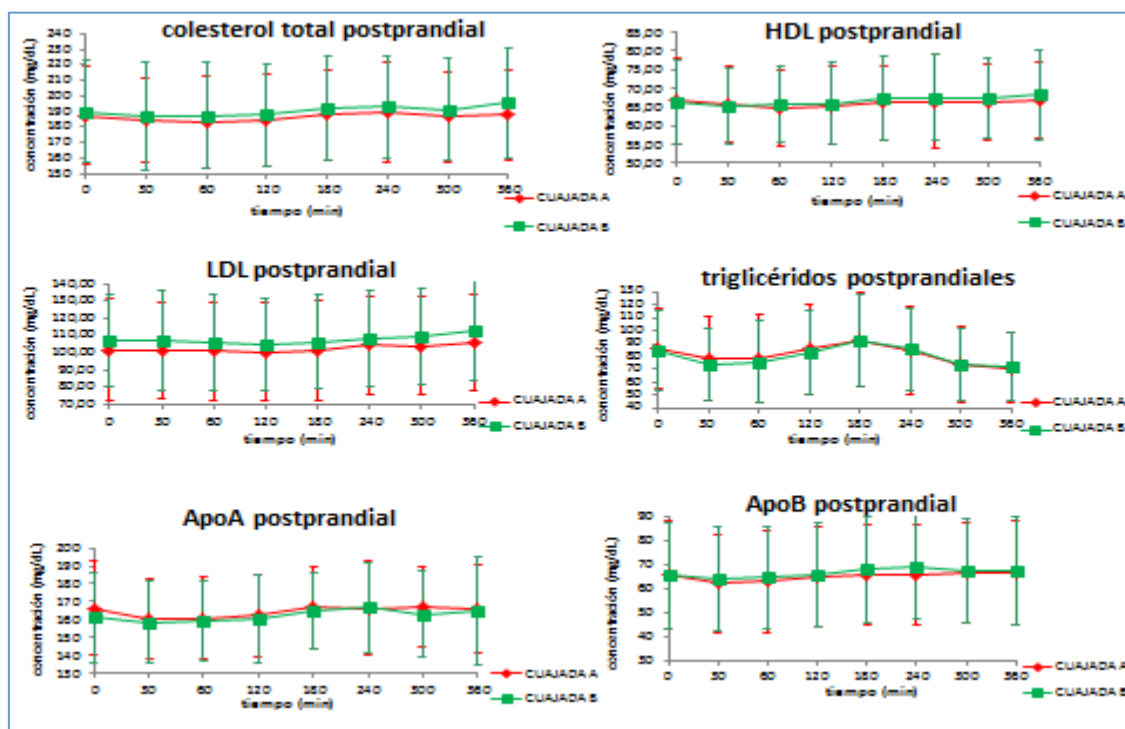


Figura 1.- Evolución posprandial (0-360 min) de los biomarcadores de metabolismo lipídico tras la ingesta de ambas cuajadas. * CUAJADA A = Cuajada Experimental; CUAJADA B = Cuajada Control. † Tiempo*Cuajada = Diferencias significativas en la interacción tipo de cuajada y tiempo ($p = 0,008$).

3.4. Perfil inflamatorio posprandial

El consumo de la cuajada experimental y la cuajada control no produjo diferencias significativas sobre las variables estudiadas: ácido úrico, homocisteína, TNF- α y PCR (Tabla 3). Al igual que en casos anteriores, también se observó un efecto significativo del tiempo sobre el comportamiento posprandial de las variables estudiadas, independientemente del tipo de cuajada consumida ($p < 0,05$).

4. DISCUSIÓN

El papel de la nutrición en la prevención de ECV ha sido ampliamente estudiado, existiendo evidencias de que los factores dietéticos pueden influir en la aterogénesis bien directamente o bien a través de marcadores clásicos de riesgo tales como el perfil lipídico, el metabolismo glucídico o el estado inflamatorio del individuo (1). Sin embargo, según nuestras investigaciones, esta es la primera vez

que se ha estudiado los beneficios de una cuajada con perfil lipídico modificado funcionalmente.

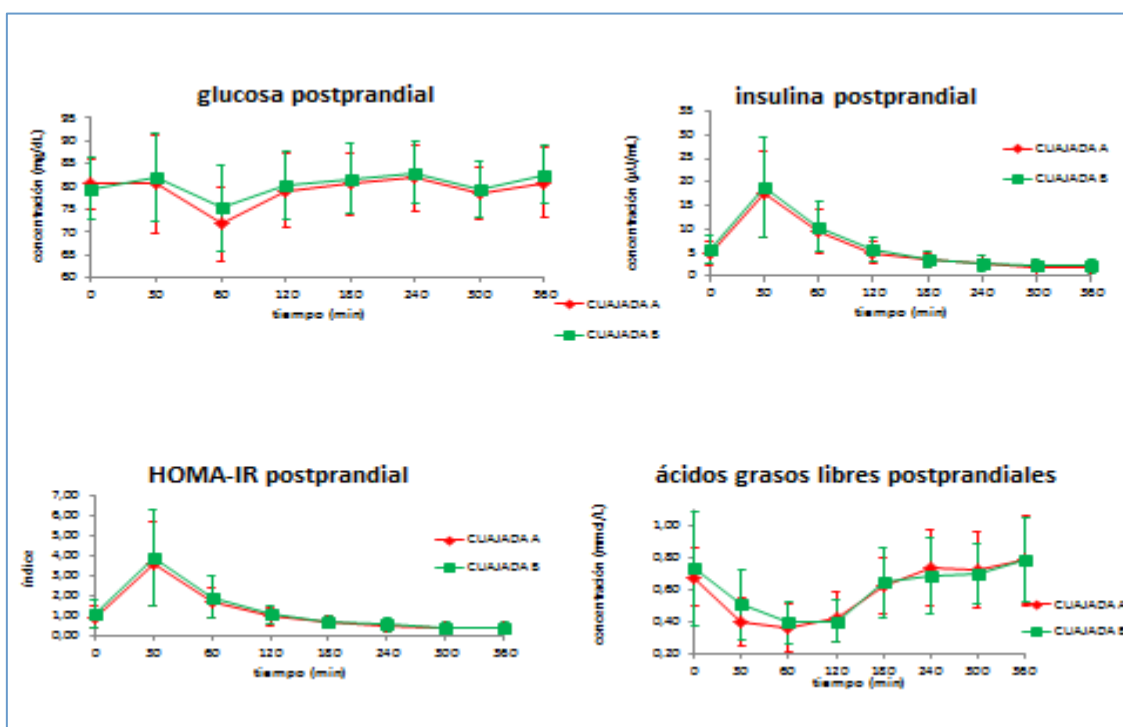


Figura 2.- Evolución posprandial (0-360 min) de los marcadores del metabolismo glucídico tras la ingesta de ambas cuajadas. * CUAJADA A = Cuajada Experimental; CUAJADA B = Cuajada Control.

Tabla 3.- Áreas bajo la curva de los marcadores de metabolismo glucídico posprandial.

	<i>Cuajada control</i> (n= 20)	<i>Cuajada experimental</i> (n= 20)	<i>p</i>
Glucosa ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}\cdot\text{min}$)	28957 \pm 2041	28462 \pm 2001	0,355
Insulina ($\text{mU}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$)	2034 \pm 850	1858 \pm 749	0,080
HOMA-IR ($\text{U}\cdot\text{min}$)	402 \pm 166	362 \pm 144	0,092
AGL ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$)	214 \pm 51	213 \pm 53	0,903

En este contexto, la cuajada es un postre lácteo ampliamente consumido en determinadas regiones de España. Además, productos lácteos que han sufrido procesos de elaboración similares se consumen ampliamente en diversos países de Europa, América y el norte de África. Por ello, y debido a la falta de información científica sobre los efectos del consumo de productos cuajados de leche de oveja modificada, se planteó la realización de la presente investigación.

Este estudio con diseño cruzado cruzado y doble ciego, evaluó los efectos del consumo de una cuajada experimental que contiene menor cantidad de ácidos grasos saturados (AGS) y mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados

(AGM), frente a los efectos de una cuajada comercial (cuajada control) sobre marcadores sanguíneos posprandiales de metabolismo lipídico, glucídico y estado inflamatorio de individuos adultos sanos. A la hora de llevar a cabo esta intervención nutricional, tanto las medidas antropométricas de los voluntarios como la cena previa al estudio, fueron controladas, de forma que la única diferencia entre ambas visitas fue el tipo de cuajada consumida y por tanto, la cantidad de AGS y AGM ingerida.

Diversos ensayos clínicos han demostrado los efectos beneficiosos del consumo de AGM sobre la lipemia, glucemia y estado inflamatorio posprandial mostrando reducciones significativas en los niveles de TG, colesterol total y c-LDL (3-5, 25). También existen algunos estudios que muestran un incremento en los niveles de c-HDL tras el consumo de una dieta rica en AGM en comparación con una dieta rica en AGS (2, 11, 26). En este proyecto, los niveles séricos de ApoA y ApoB han sido medidos en el estado posprandial. Ambos biomarcadores lipídicos han sido propuestos como marcadores de riesgo de ECV (3, 25, 27). El consumo de la cuajada experimental produjo un importante descenso en los niveles posprandiales de ApoB en comparación con la cuajada control, con reducciones modestas y no significativas de colesterol total y c-LDL, encontrándose efectos similares entre cuajadas en el resto de marcadores posprandiales de metabolismo lipídico (c-HDL, TG o ApoA). Nuestros resultados están en consonancia con los obtenidos por estudios previos (2, 3, 26-28), aunque el descenso observado en nuestro caso es menos intenso, lo que podría explicarse debido a la menor cantidad de AGM ingerida, el hecho de que los sujetos fueran sanos o por la duración del estudio posprandial.

Los AGM han tomado un papel de gran relevancia gracias a su capacidad para regular la respuesta glucémica y mejorar la sensibilidad a la insulina (29). Sin embargo, en el caso de los AGS, comparativamente a su efecto nocivo sobre los lípidos circulantes, se ha demostrado que empeoran la respuesta glucémica y la sensibilidad a la insulina (30), especialmente en células del músculo esquelético(31).

Respecto al metabolismo glucídico posprandial, en nuestro ensayo no se han encontrado diferencias significativas en el efecto de ambos tipos de cuajada sobre los biomarcadores estudiados; dichos resultados coinciden con los obtenidos por estudios previos (23, 32-35). En nuestro caso, se ha observado una ligera tendencia en el Área bajo la curva de la insulina y el índice HOMA, lo cual sugiere una relativa mejora en la sensibilidad a la insulina tras la ingesta de la cuajada experimental. Este resultado coincide con estudios previos que, aunque no siendo mayoritarios, han demostrado una mejora de la sensibilidad a la insulina tras la ingesta de una dieta rica en AGM en comparación con dietas ricas en AGS (36, 37).

La asociación existente entre una respuesta lipémica posprandial elevada y un incremento en el riesgo de padecer ECV está ampliamente descrita, basada entre otros, en mecanismos de activación endotelial e inflamación (11). Las grasas ingeridas en la dieta pueden influir en la expresión diferencial de marcadores de inflamación en el estado posprandial del individuo (37, 38), pero no hay suficientes estudios evaluando los efectos de diferentes patrones dietéticos en marcadores de inflamación sistémica y disfunción endotelial, procesos ambos involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis. En este estudio, el efecto del consumo de una cuajada experimental en la evolución posprandial de biomarcadores del estado inflamatorio y su posible relación con la lipemia posprandial, no produjo cambios significativos en los marcadores medidos. Estos resultados corroboran los datos obtenidos en otros estudios previos, que investigaron los efectos de diferentes grasas dietéticas en el estado inflamatorio posprandial de sujetos sanos (11, 28, 30, 37).

5. CONCLUSIONES

La cuajada experimental, que presenta mayor proporción de AGM y AGP y menor cantidad de AGS en su composición nutricional, presenta un posible efecto beneficioso en relación al metabolismo lipídico, como se observa en la reducción estadísticamente significativa de los niveles séricos posprandiales de Apolipoproteína-B tras su ingesta. El posible efecto de mejora de la sensibilidad a la insulina tras el consumo de la cuajada modificada y mejorada en ácidos grasos, sugiere la necesidad de profundizar en los mecanismos implicados para confirmar los efectos propuestos.

6. CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

7. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CDTI (Ministerio de Ciencia e Innovación) y SAT Ultzamakoa por la financiación de este proyecto y a SAT Ultzamakoa por proporcionar el producto de estudio.

Los autores también quieren agradecer a todos los voluntarios su participación en el estudio y a Verónica Ciaurriz, Blanca Martínez de Morentin, María Hernández y Salomé Pérez su ayuda técnica, así como el interés en el desarrollo del ensayo.

8. REFERENCIAS

1. van Oostrom AJ, van Wijk J, Cabezas MC. Lipaemia, inflammation and atherosclerosis: novel opportunities in the understanding and treatment of atherosclerosis. *Drugs* 2004;64:19-41.
2. Cardona F, Tunez I, Tasset I, Murri M, Tinahones FJ. Similar increase in oxidative stress after fat overload in persons with baseline hypertriglyceridemia with or without the metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2008;41:701-705.
3. Cohn JS. Postprandial lipemia and remnant lipoproteins. *ClinLabMed* 2006;26:773-786.
4. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, et al. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2001;154:475-483.
5. Watts GF. Postprandial lipaemia in familial hypercholesterolaemia: clinical and metabolic significance. *Atherosclerosis* 2000;148:426-428.
6. van Oostrom AJ, Alipour A, Sijmonsma TP, Verseyden C, Dallinga-Thie GM, Plokker HW, et al. Comparison of different methods to investigate postprandial lipaemia. *Neth J Med* 2009;67:13-20.
7. Davignon J, Cohn JS. Triglycerides: a risk factor for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996;124:S57-S64.
8. Burdge GC, Calder PC. Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? *Br J Nutr* 2005;93:3-9.
9. Bergeron N, Havel RJ. Assessment of postprandial lipemia: nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:43-52.
10. Castro Cabezas M, Halkes CJ, Meijssen S, van Oostrom AJ, Erkelens DW. Diurnal triglyceride profiles: a novel approach to study triglyceride changes. *Atherosclerosis* 2001;155:219-228.
11. Mekki N, Charbonnier M, Borel P, Leonardi J, Juhel C, Portugal H, et al. Butter differs from olive oil and sun flower oil in its effects on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy youngmen. *J Nutr* 2002;132:3642-3649.
12. Vafeiadou K, Weech M, Sharma V, Yaqoob P, Todd S, Williams CM, et al. A review of the evidence for the effects of total dietary fat, saturated, monounsaturated and n-6 polyunsaturated fatty acids on vascular function, endothelial progenitor cells and microparticles. *Br J Nutr* 2012;107:303-324.
13. Poppitt SD, Keogh GF, Lithander FE, Wang Y, Mulvey TB, Chan YK, et al. Postprandial response of adiponectin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and C-reactive protein to a high-fat dietary load. *Nutrition* 2008;24:322-329.
14. Thomsen C, Rasmussen O, Christiansen C, Pedersen E, Vesterlund M, Storm H, et al. Comparison of the effects of a monounsaturated fat diet and a high carbohydrate diet on cardiovascular risk factors in first degree relatives to type-2 diabetic subjects. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:818-823.
15. Grundy SM. Transmonounsaturated fatty acids and serum cholesterol levels. *N Engl J Med* 1990;323:480-481.
16. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Binkoski AE. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Nutr Rev* 2004;62:414-426.
17. de Bruin TW, Brouwer CB, van Linde-Sibenius-Trip M, Jansen H, Erkelens DW. Different postprandial metabolism of olive oil and soybean oil: a possible mechanism of the high-density lipoprotein conserving effect of olive oil. *Am J Clin Nutr* 1993; 58:477-483.
18. Gillingham LG, Harris-Janzen S, Jones PJ. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids* 2011;46:209-228.
19. Schwingshackl L, Strasser B, Hoffmann G. Effects of monounsaturated fatty acids on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Ann Nutr Metab* 2011;59:176-186.
20. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ* 2008;337:a1344.
21. Buckland G, Gonzalez CA, Agudo A, Vilardell M, Berenguer A, Amiano P, et al. Adherence to the Mediterranean diet and risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2009; 170:1518-1529.

22. Ceriello A, Falletti E, Motz E, Taboga C, Tonutti L, Ezsol Z, et al. Hyperglycemia-induced circulating ICAM-1 increase in diabetes mellitus: the possible role of oxidative stress. *Horm Metab Res* 1998;30:146-149.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrikson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
24. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
25. Castro Cabezas M, Erkelens DW, Kock LA, De Bruin TW. Postprandial apolipoprotein B100 and B48 metabolism in familial combined hyperlipidaemia before and after reduction of fasting plasma triglycerides. *Eur J Clin Invest* 1994;24:669-678.
26. Gómez-Coronado Cáceres D. Salida celular y transporte reverso de colesterol. *Clin Invest Arterioscl* 2010;22:12-16.
27. Patsch W, Esterbauer H, Foger B, Patsch JR. Postprandial lipemia and coronary risk. *Curr Atheroscler Rep* 2000;2:232-242.
28. Bendtsen LQ, Lorenzen JK, Larsen TM, van Baak M, Papadaki A, Martinez JA, Handjieva-Darlenska T, Jebb SA, Kunešová M, Pfeiffer AF, Saris WH, Astrup A, Raben A. Associations between dairy protein intake and body weight and risk markers of diabetes and CVD during weight maintenance. *Br J Nutr*. 2014;111:944-953.
29. Hofman Z, van Drunen JD, de Later C, Kuipers H. The effect of different nutritional feeds on the postprandial glucose response in healthy volunteers and patients with type II diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58:1553-1556.
30. Vessby B, Karlstrom B, Ohrvall M, Jarvi A, Andersson A, Basu S. Diet, nutrition and diabetes mellitus. *Ups J Med Sci* 2000;105:151-160.
31. Bergouignan A, Momken I, Schoeller DA, Simon C, Blanc S. Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: the Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms. *Prog Lipid Res* 2009;48:128-147.
32. Gallaher D SB. Fibra alimentaria. In: Ziegler EE, Filer LJ, (eds). *Conocimientos actuales sobre nutrición*. Ed. Washington; 1997. p. 95.
33. Sarmiento Mendez LM, Roca-Cusachs Coll A, Arroyo Diaz JA, Benet Gusta MT, Sole Villa MJ, Franco Peral M. Comparison of the definitions of the metabolic syndrome according to ATP III and IDF. *Rev Clin Esp* 2008;208:333-338.
34. Hauner H. Insulin resistance and the metabolic syndrome-a challenge of the new millennium. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:S25-29.
35. Weber MA, Schiffrin EL, White WB, Mann S, Lindholm LH, Kenerson JG, Flack JM, Carter BL, Materson BJ, Ram CV, Cohen DL, Cadet JC, Jean-Charles RR, Taler S, Kountz D, Townsend R, Chalmers J, Ramirez AJ, Bakris GL, Wang J, Schutte AE, Bisognano JD, Touyz RM, Sica D, Harrap SB. Clinical practice guide lines for the management of hypertension in the community a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2014; 32:3-15
36. De Caterina R, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:213S-223S.
37. Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Pinillos MD, Gomez P, Paz-Rojas E, Montilla P, et al. A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons. *Diabetologia* 2001;44:2038-2043.
38. Tholstrup T, Sandstrom B, Bysted A, Holmer G. Effect of 6 dietary fatty acids on the postprandial lipid profile, plasma fatty acids, lipoprotein lipase, and cholesterol ester transfer activities in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 2001 Feb;73(2):198-208.

INFORMACIÓN ACADÉMICA



Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia
e-mail: secretaria@ranf.com

Reiniciada la actividad académica tras el ralentí estival de los meses de julio y agosto, en el mes de septiembre se celebraron dos sesiones científicas, de las cuales una fue la conferencia impartida por el Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, y otra una Mesa Redonda organizada por la Sección 6ª de Historia, Legislación y Bioética, coordinada por la Excma. Sra. Dña. Rosa María Basante Pol.

El 18 de septiembre tuvo lugar a las 19 horas, la conferencia celebrada en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF, sobre “Los equipos interprofesionales y la terapia personalizada” a cargo del Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número de la RANF.

El 25 de septiembre la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la Mesa Redonda en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF sobre: “Medicamentos falsificados y seguridad del paciente”, coordinada por la Académica de Número y Presidenta de la Sección 6ª, Excma. Sra. Dña. Rosa Basante Pol. Contó con las ponencias de los Dres. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número de la RANF que disertó sobre: “La seguridad del paciente en el sistema sanitario”; D. Álvaro Domínguez-Gil Hurlé, Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia, cuya ponencia tuvo por título “Medicamentos falsificados. Un problema de salud pública”; y la Dra. Belén Escribano Romero, Jefa del Departamento de Inspección y Control de Medicamentos de la AEMPS, que disertó sobre el tema: “Nuevo marco legal para combatir la falsificación de medicamentos”, que entusiasmó al público asistente que disfrutó de una animada discusión.

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos durante este último trimestre hay que destacar que, nuestra Académica Correspondiente y Presidenta del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, la Ilma. Sra. Dña. Carmen Peña López, fue elegida Presidenta de la Federación Internacional Farmacéutica (FIP), en el reciente Congreso habido el mes de agosto en Bangkok.

Asimismo, nuestros Académicos Extranjeros, los Profesores Dr. Dn. Rubén Hilario Manzo y Dr. Dn. Andrés Amarilla, fueron elegidos Presidente de la

Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia y Vice-Rector de la Universidad Nacional de Asunción, respectivamente.

En el capítulo de obituarios, tenemos que lamentar el fallecimiento de nuestra Académica de Honor electa, la Excma. Sra. Dña. Consuelo de la Torre García Quintana, el pasado 2 de septiembre en Madrid.

La Dra. de la Torre ingresó como Académica Correspondiente de la RANF en enero de 2005 y en 2011 fue elegida Académica de Honor electa.

Destacó con excelencia en su personalidad humana y como eminente científica. Académica destacada de gran capacidad intelectual y calidad humana. Poseía una formación amplia y sólida reconocida en los ambientes científicos nacionales e internacionales, que se reflejaba en la calidad de sus publicaciones, en sus numerosas comunicaciones y ponencias en Congresos nacionales e internacionales. Así como en la gran labor docente realizada en cursos, conferencias, seminarios, tutorías, dirección de Tesis y trabajos de licenciatura como Profesora de Investigación del CSIC, dedicada siempre al estudio del ciclo y proliferación celulares.

La Dra. de la Torre participó también en artículos de difusión en periódicos y en revistas de divulgación científica, en la radio y la TVE, tan necesarias para el conocimiento público de la investigación científica y formación de la sociedad española.



PUBLICACIONES ELECTRÓNICAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA