

# **ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA**



Volumen. 83, Número 2 - Abril - Junio (2017)





# Historical perspective of antimalarials of natural origin

**Title in Spanish:** *Perspectiva histórica de antimaláricos de origen natural*

Ana María Mesa Vanegas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Docente- Investigador, Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Biología. Calle 67 # 53 – 108. A.A 1226. Medellín, Colombia.

**ABSTRACT:** Today, many diseases are treated thanks to the discovery of compounds from plants, which shows that they play a significant role in the discovery and development of new drugs. One of the alternatives for the control of malaria morbidity and mortality is chemotherapy, which has been made possible by the discovery of compounds from plants. At present, about half of the available antimalarials drugs are naturally occurring compounds or are related to them. This review provides a historical account of the origin and development of the main antimalarials as an instrument of architectural facts, which maintains a close relationship with the antimalarials referents, which serve as models to deepen the search for new natural chemical substances that could contribute to the Control of a devastating disease like malaria, where resistant strains of *Plasmodium* are being presented to the main treatments, therapeutic failure, in addition to poor access to medicines, among other factors; which complicate their prevention and treatment.

**RESUMEN:** Hoy, muchas enfermedades son tratadas gracias al descubrimiento de compuestos a partir de las plantas, lo que evidencia que estas juegan un papel significativo en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Una de las alternativas para el control de la morbi-mortalidad por malaria es la quimioterapia, la cual ha sido posible gracias al descubrimiento de compuestos a partir de las plantas. En la actualidad, cerca de la mitad de los fármacos antimaláricos disponibles son compuestos naturales o están relacionados con ellos. En esta revisión se hace un recuento histórico del origen y desarrollo de los principales antimaláricos como instrumento de hechos arquitectónicos, que mantienen una estrecha relación con los referentes antimaláricos, que sirven de modelos para profundizar en la búsqueda de nuevas sustancias químicas naturales que podrían contribuir al control de una devastadora enfermedad como la malaria, donde se están presentando cepas resistentes de *Plasmodium* a los principales tratamientos, falla terapéutica, además de un escaso acceso a los medicamentos, entre otros factores; que complican su prevención y tratamiento.

\*Corresponding Author: amaria.mesa@udea.ecu.co

Received: Mars 22, 2017 Accepted: April 26, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 2 (2017), pp. 167-174

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria que presenta la más alta morbilidad dentro de las enfermedades de este tipo y es la tercera en el mundo en casos de muerte por infección, después de la tuberculosis y la infección por VIH/SIDA (1). Esta enfermedad es causada por un parásito de género *Plasmodium*, transmitido a los seres humanos por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*, que se reproduce en regiones que combinan calor, humedad y vegetación (2). Las principales especies de *Plasmodium* que afectan al hombre son *P. vivax* y *P. falciparum*, siendo *P. falciparum* la más peligrosa, dada su patogenicidad que en muchas ocasiones lleva a la muerte del individuo. Existen otras dos especies de importancia regional, *P. malariae* y *P. ovale*, que causan formas benignas de la malaria. En sangre circulante, se diferencian cuatro formas parasitarias: trofozoítos (en parásitos jóvenes tienen forma de anillos), esquizontes, gametocitos y merozoítos, que son las formas que invaden (presentan

forma oval). (3,4). Después de la Segunda Guerra Mundial hasta los 80's, el amplio uso de la cloroquina para la profilaxis antimalárica, asociado con la lucha contra el mosquito por medio del drenaje de las tierras húmedas y el empleo de insecticidas, facilitó en gran parte una reducción de áreas endémicas. En 1874, Othmer Zeider un estudiante de doctorado alemán con su tutor Adolf von Baeyer en la Universidad de Estrasburgo, sintetizó el dicloro difenil tricloroetano (DDT), pero sus propiedades insecticidas no se exploraron hasta 1939 cuando Paul Müller las descubrió en Suiza. Varios ejércitos de la Segunda Guerra Mundial lo utilizaron para combatir el tifus propagado por los piojos. El DDT se utilizó para el control de la malaria tras la guerra ya que fue muy efectivo contra los mosquitos causantes de la transmisión. Müller ganó el Premio Nobel de medicina en 1948 por tan importante descubrimiento (5). Con el éxito del DDT y el descubrimiento de antimaláricos sintéticos más efectivos y menos tóxicos, la Organización Mundial de la Salud lanzó

una ambiciosa campaña mundial de erradicación de la malaria.

En 1959 la Organización Mundial de la Salud enfocó el control de la malaria en un programa conocido como erradicación de la malaria y en 1968 se logró eliminar en Estados Unidos y Europa (6). La campaña comenzó y se centró en el rociamiento de casas con insecticidas permanentes, tratamientos con antimaláricos y vigilancia en cuatro etapas sucesivas; preparación, ataque, consolidación y mantenimiento. La prohibición del uso del DDT, debido a su acumulación en las cadenas tróficas y especialmente con el desarrollo de resistencias a los antimaláricos por parte de *Plasmodium* y la dificultad para obtener fondos y falta de cooperación de las comunidades, hizo el esfuerzo insostenible. Las campañas de erradicación se han abandonado a favor de las de control (5). Sin embargo, pese a la gran lucha y a las extremas medidas implementadas, en el año 1959 se presentó el primer caso de resistencia a la cloroquina en Colombia y poco tiempo después en el sureste de Asia, y a partir de estos reportes la resistencia se ha venido expresando en diferentes países de Asia, África y Latinoamérica donde específicamente *P. falciparum* es endémico (1), lo cual se ha relacionado, principalmente a cambios biológicos en el parásito, contribuyendo a la persistencia y letalidad de esta enfermedad, aumentando su prevalencia en los últimos 15 años y disminuyendo la efectividad de los medicamentos en muchos países donde la enfermedad es endémica (7).

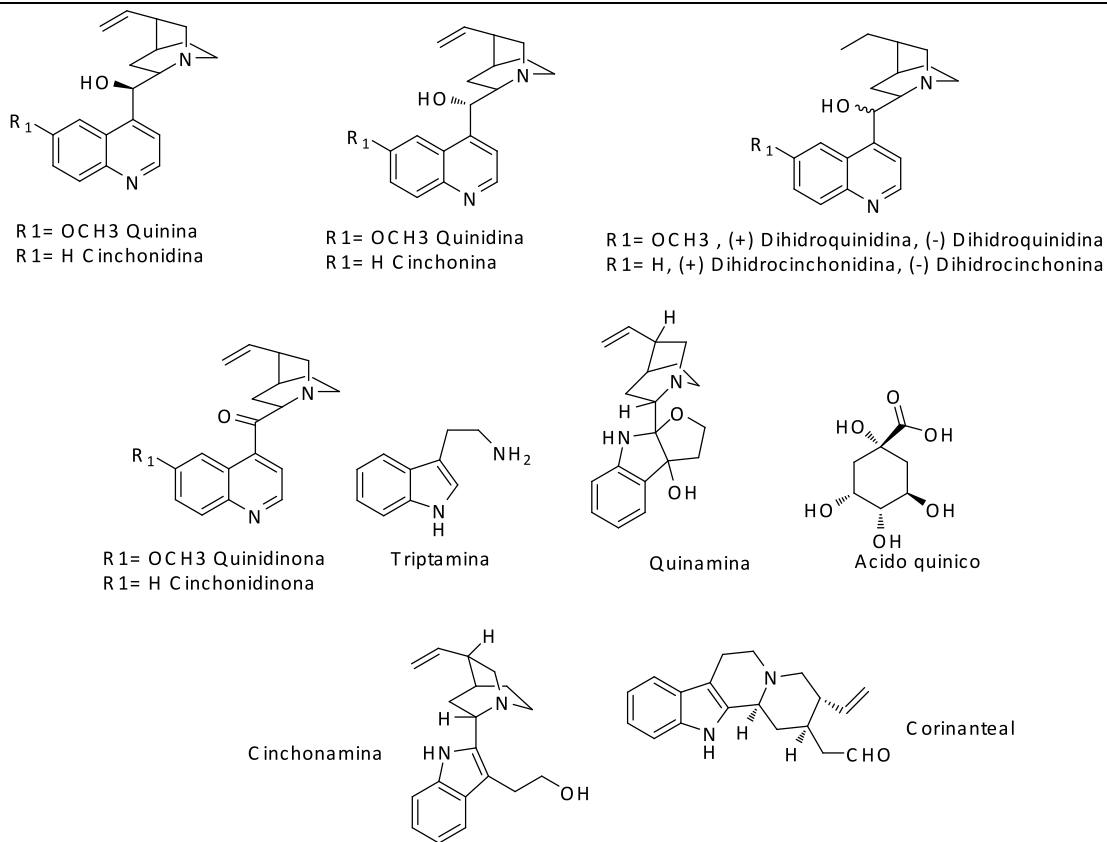
El impacto de la malaria no se siente solamente en términos de sufrimiento humano y como causa de muerte, sino también por el significativo costo y la carga económica que supone, tanto para las familias como para la economía de los países donde es endémica. Se estima que cada año la malaria le cuesta a África 12 billones de dólares del producto nacional bruto (PNB) y que la enfermedad ha reducido el crecimiento económico en África un 1,3 por ciento cada año como resultado de la pérdida de vidas y una menor productividad. Además, si las previsiones del IPCC (The Intergovernmental Panel on Climate Change) respecto al cambio climático se cumplen, el aumento de la temperatura en la tierra implicará un aumento de las enfermedades tropicales en otras latitudes (8). Se estima que la malaria está presente en 99 países y se presentan anualmente entre 300 a 500 millones de casos de malaria por año y mueren más de 1 millón, en su mayoría niños menores de 5 años. La mayor parte de los casos se producen en África. El número va en aumento, a pesar de que en grandes zonas del mundo el mal había sido prácticamente erradicado (9). En esta revisión se hace un recuento histórico del origen y desarrollo de los principales antimaláricos como instrumento de hechos arquitectónicos, que mantienen una estrecha relación con los referentes antimaláricos, que sirven de modelos para profundizar en la búsqueda de nuevas sustancias químicas naturales que podrían contribuir al control de una devastadora enfermedad como la malaria, donde se están presentando cepas resistentes de *Plasmodium* a los principales

tratamientos, falla terapéutica, además de un escaso acceso a los medicamentos, entre otros factores, que complican su prevención y tratamiento.

## 2. QUININA Y DERIVADOS

Una de las alternativas para el control de la morbi-mortalidad por malaria es la quimioterapia, la cual ha sido posible gracias al descubrimiento de compuestos a partir de las plantas. Un alcaloide que ha jugado un papel importante y esencial en la medicina por cientos de años es la quinina. Su química ha fascinado a muchos investigadores y ha motivado cambios en la química orgánica, síntesis enantioselectiva y en la química industrial moderna (10). Es un compuesto natural obtenido de una planta nativa de la cordillera de Los Andes de género *Cinchona* (Rubiaceae). La planta fue empleada por los incas del Perú para tratar las fiebres, principalmente aquellas asociadas con la malaria. Una enfermedad devastadora y debilitante, que diezmó a los ejércitos y frenó el crecimiento de muchas civilizaciones (11). El milagro de la cura con la administración de un tónico antipirético del árbol de la quina-quina de la condesa de Chinchón, consorte de España virrey de Perú a principios del siglo XVI, trascendió a la gente local y fue llevada por los misioneros jesuitas a las cortes europeas. La corteza de la quina llegó a ser muy popular y fue exportada a través del océano Atlántico en grandes cantidades, salvando a millones de personas alrededor del mundo. El polvo de la quina motivó a muchos científicos al aislamiento del principio activo denominado quina-quina.

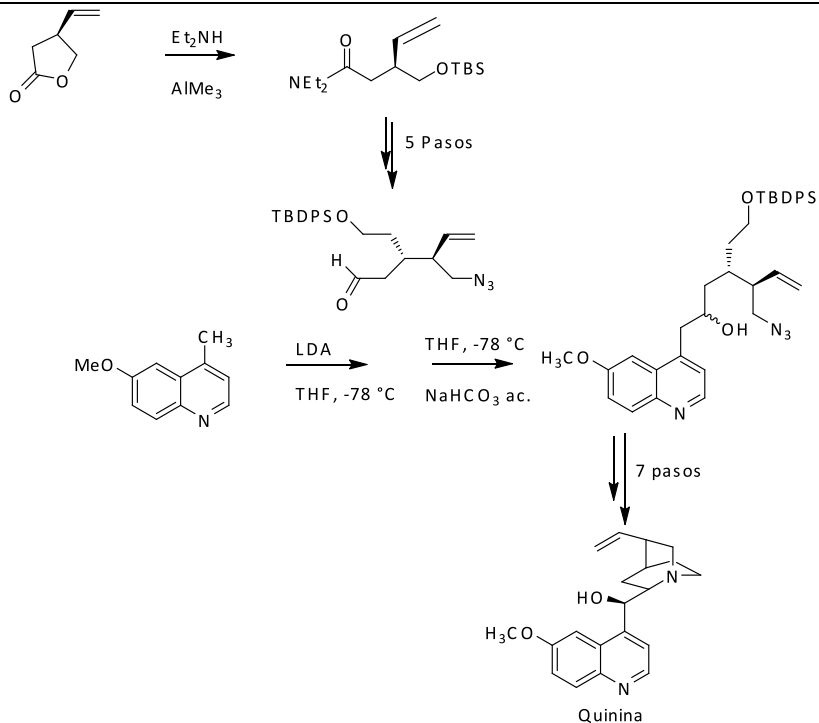
En 1746 el conde Claude Toussaint aisló un compuesto cristalino que se creía era el constituyente activo, pero mucho después se descubrió que era la sal del ácido quínico y no fue hasta 1820 que los químicos franceses Pierre Joseph Pelletier y Joseph Bienaimé Caventou aislaron un número importante de alcaloides, incluyendo la emetina aislada de la ipecacuana (*Carapichea ipecacuanha*), la estricnina y brucina de la nuez vómica (*Strychnos nux-vomica*), la quinina junto con varios alcaloides isoméricos de la corteza de *Chincona officinalis* (Figura 1) (12). El material procesado demostró ser efectivo para tratar la malaria lo que finalizó las décadas de investigación del componente activo de la quina-quina. Esta fue la primera sustancia química pura administrada a un ser humano y se convirtió en el único antimalárico utilizado durante varios siglos (13). Sin embargo, en el siglo XIX no se contaban con técnicas de elucidación estructural modernas tales como la espectrometría de masas, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la cristalografía de rayos X; la determinación estructural de la quinina requirió también un arduo trabajo químico. En 1908, el químico alemán Paul Rabe publicó la correcta conectividad de los átomos de la quinina y al cual se le atribuye la síntesis parcial de la quinina y derivados obteniendo una mezcla de esteroisómeros.



**Figura 1. Compuestos aislados de género *Cinchona* (Rubiaceae).**

En 1944, Robert Woodward, un revolucionario de la síntesis total, y su estudiante, William von Eggers Doering, publican la síntesis total de la quinina por síntesis de quinotoxina, pero sin un control de la estereoquímica

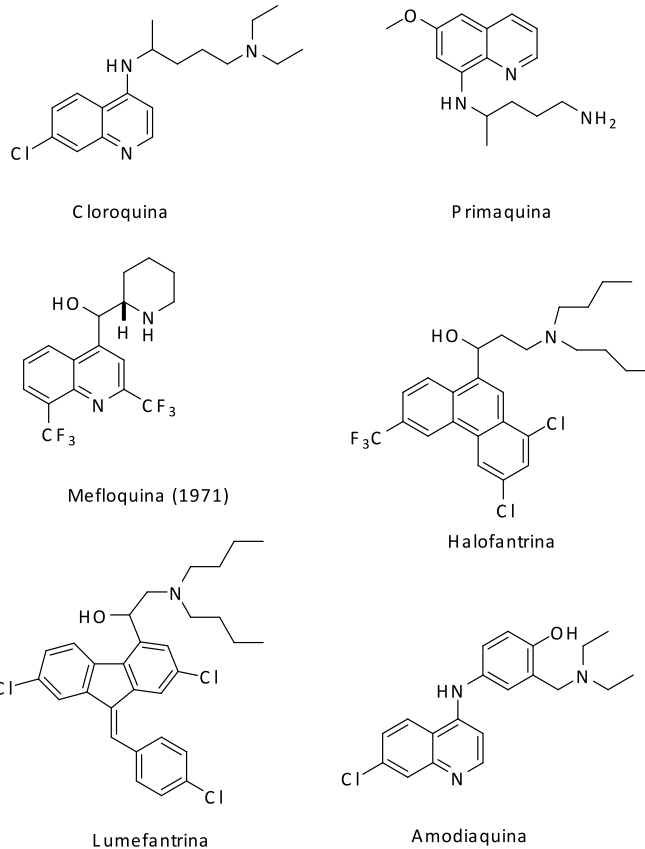
del anillo bicíclico y no fue hasta el año 2001 que Gilbert Stork publica la síntesis total estereoselectiva de la quinina (Figura 2) (14-16).



**Figura 2. Síntesis estereoespecífica de la quinina por Stork.**

La quinina se convirtió en un compuesto líder para el tratamiento de la malaria y ha sido empleado como modelo para realizar nuevos agentes antimaláricos por vía sintética, como lo son: la cloroquina, amodiaquina, mefloquina, primaquina, halofantrina y lumefantrina (Figura 3) (17). Todos estos son utilizados para el tratamiento de la malaria y actúan generalmente sobre el estado asexual intraeritrocítico del parásito y se han clasificado según su estructura química y su modo de

acción (1). La elección de uno o más antimaláricos para el tratamiento de la malaria, está determinado por factores, tales como la especie del parásito causante de la infección, el estado de inmunidad adquirida del paciente, la susceptibilidad-resistencia del parásito, el estado clínico del paciente y los recursos disponibles para los cuidados de la salud (4).



**Figura 3. Antimaláricos análogos de la quinina.**

Uno de los antimaláricos de mayor trascendencia en la terapia antimalárica es la cloroquina. Fue descubierto por el alemán Andersag en 1934 y se estableció como terapia de forma general tras la guerra en 1946. La síntesis propuesta por Surrey y Hammer 1946 generó otro impacto para la humanidad, ya que presentó una alta eficacia terapéutica, baja toxicidad y un bajo costo de manufactura (menos de US \$ 0,2 para tres días de tratamiento en un adulto). Desafortunadamente, el parásito *P. falciparum* presentó resistencia en 1959 en Colombia y poco tiempo después en el sureste de Asia (1); actualmente es inútil en áreas endémicas. Al igual que con otros medicamentos quinolínicos, el mecanismo de acción de la cloroquina y sus derivados no se ha resuelto por completo. La hipótesis más aceptada de la acción de la cloroquina es que interactúa con el hemo libre citotóxico que se acumula en los parásitos, lo que lleva a la muerte del parásito.

### 3. ANTIBIÓTICOS ANTIMALÁRICOS

Por otra parte, otro tipo de medicamentos con acción antimalárica son los antibióticos sulfadoxina (1932) (antibióticos de sulfonamida que inhiben la formación de ácido fólico bacteriano), tetraciclina, rifampicina, doxiciclina, proguanil, minociclina, clindamicina y la pirimetamina o Malarone (proguanil con atovaquona). Estos se utilizan en la terapia oral, tienen actividad antimalárica pero son de acción lenta, por lo que deben asociarse a otros antimaláricos de acción rápida como la pirimetamina, quinina, amodiaquina o cloroquina. Su modo de acción se basa en la inhibición de enzimas involucradas en la síntesis de ácido fólico, procesos claves para la supervivencia del parásito, que se llevan a cabo en el apicoplasto, una organela típica del orden apicomplexa, donde se sintetizan isoprenoides y el hemo (Figura 4) (18).

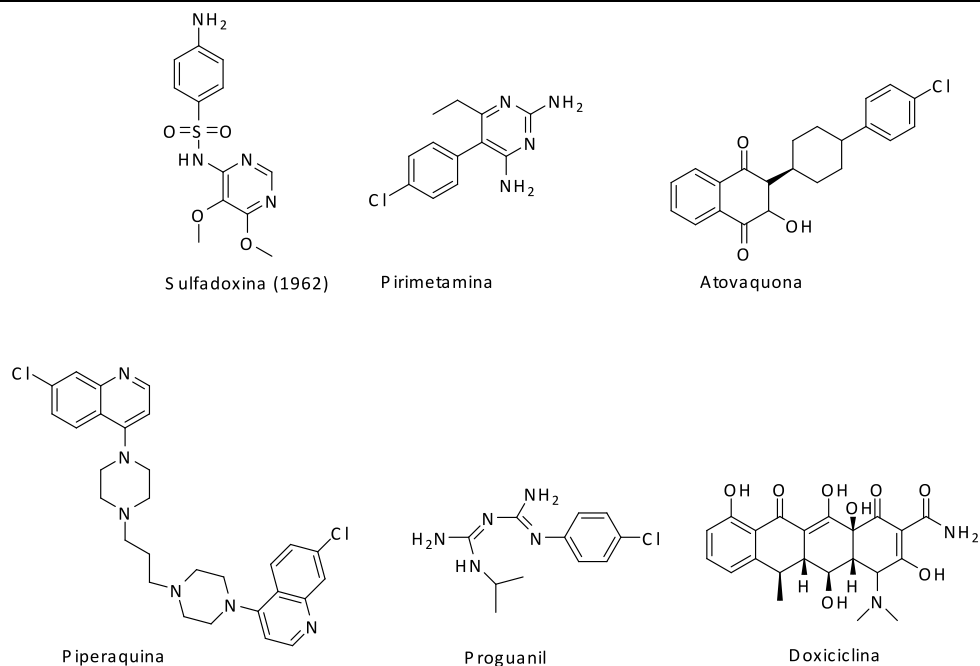


Figura 4. Medicamentos antibióticos que actúan como antimaláricos.

#### 4. ARTEMISININAS Y DERIVADOS

En las últimas dos décadas, nuevos antimaláricos han sido desarrollados a partir de los productos vegetales, como lo prueba el descubrimiento y desarrollo de la artemisinina a partir de la planta *Artemisia annua* (Asteraceae), una hierba China conocida popularmente en este país como Qing hao y empleada por la medicina tradicional por más de 2000 años para el tratamiento de fiebres (20). La artemisinina fue aislada en 1971 por químicos chinos que trabajaron con el aislamiento del principio activo a partir de esta planta. Esta molécula representa una nueva clase de antimaláricos, tiene la estructura de una sesquiterpenolactona tipo trioxano con un puente endoperóxido, así se le confiere su actividad biológica, aunque es poco soluble en agua (7). Debido a la naturaleza altamente lipofílica y pobre solubilidad, la artemisinina presenta la desventaja de una pobre vida media en plasma, por lo que es muy probable que no se consiga eliminar el parásito de forma completa en el organismo, de ahí la necesidad de tratamiento prolongados con este fármaco. La artemisinina es un antimalárico muy efectivo, aunque tiene el inconveniente de su elevado precio y pobre biodisponibilidad. Este medicamento no puede ser vendido a un costo de menos de US. \$ 1-2 en

pautas curativas combinadas, un precio prohibitivo en la mayoría de las regiones endémicas de malaria. El desarrollo de las artemisininas para el tratamiento de la malaria grave comenzó en 1987, cuando agricultores de China, Vietnam y partes de África empezaron a cultivar *Artemisia annua*, materia prima para el aislamiento de la artemisinina. Sin embargo, la planta crece de forma relativamente lenta y el proceso de extracción de la artemisinina a partir de las hojas de *Artemisia annua* es complejo y requiere bastante tiempo (21). La artemisinina fue comercializada en 1992 y se han preparado derivados semisintéticos de artemisinina para mejorar principalmente su biodisponibilidad o actividad. Entre ellos se encuentran dihidroartemisinina (DHA), artesunato (AS), y arteméter (AM), todos los cuales actúan como profármacos y se metabolizan para dar dihidroartemisinina en el cuerpo (Figura 5). Este último es el metabolito con mayor actividad esquizonticida conocida. El artesunato es un derivado hemi-sintético de la artemisinina cuya solubilidad en agua facilita la absorción y resulta ventajoso frente a la artemisinina ya que, a diferencia de esta, se pueden formular fácilmente preparaciones orales, rectales, intramusculares e intravenosas (22).

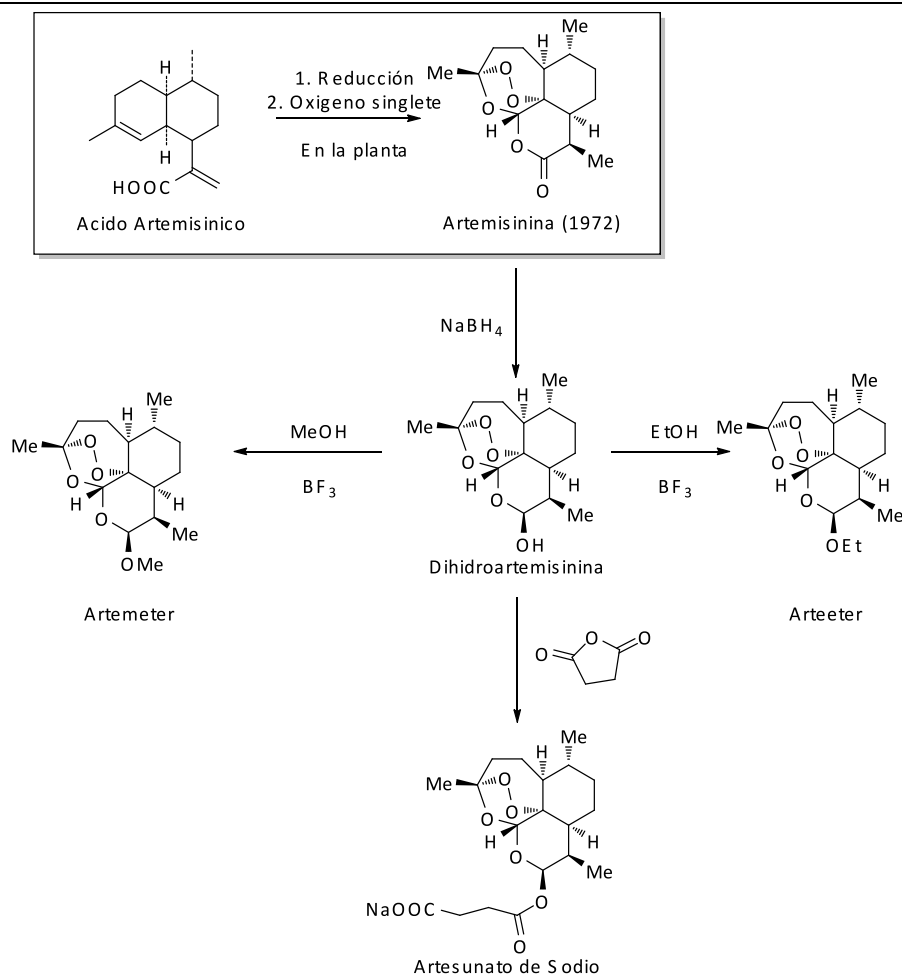


Figura 5. Artemisinina y sus derivados.

Estos compuestos presentaron una gran actividad como esquizotónicas sanguíneas y son de gran utilidad en el tratamiento de la malaria complicada causada por *P. falciparum*, especialmente para las cepas resistentes a la cloroquina (23). En cuanto al mecanismo de acción, su actividad biológica es dependiente de la ruptura del puente endoperoxídico, tras la interacción del Fe<sup>2+</sup> del grupo hemo en el interior de la vacuola digestiva, generándose radicales libres que alquilan el grupo hemo. Aunque también el puente endoperoxídico puede actuar a nivel de la formación de la hemozoina o como fuente de radicales hidroxilo y posiblemente sobre otras proteínas del parásito. Estudios recientes apuntan a que la Artemisinina es un inhibidor de SERCA (Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplásmico, PfATP6) de *Plasmodium* (24).

En el año 2001, la OMS lanzó su campaña Roll Back Malaria Partnership, haciendo hincapié en el uso de artemesininas en terapias combinadas junto con otros antimaláricos como lumefantrina, amodiaquina, mefloquina, sulfadoxina o pirimetamina. De hecho, las terapias combinadas con artemisinina (TCA) constituyen el tratamiento sugerido para la malaria en todas las zonas endémicas (25). La TCA suele consistir en un tratamiento combinado de un derivado de artemisinina con otro

antimalárico, como la piperaquina o la amodiaquina.

Las TCAs actualmente siguen siendo el tratamiento más efectivo para la malaria sin complicaciones causada por *P. falciparum*. Los derivados de artemisinina son muy eficientes en la disminución de biomasa de parásitos y en la terapia combinada con otro antimalárico (26). Sobre la base de los conocimientos actuales acerca de la resistencia a artemisinina y sus derivados, el retraso en la eliminación de parásitos, que se observa en la actualidad en áreas de resistencia a artemisinina y sus derivados, no parece afectar la eficacia global de las TCAs, siempre y cuando el fármaco acompañante a la artemisinina sea eficaz (27). Sin embargo, hay algunos puntos oscuros en lo que se refiere al futuro de las TCAs: en concreto, no está claro si el tiempo en que se tarda en eliminar los parásitos se seguirá incrementando como se ha venido observando hasta ahora, ni cómo evolucionará la resistencia a la artemisinina y sus derivados (28).

En la actualidad, la mayoría de los fármacos originados a partir de las plantas siguen teniendo una posición destacada pese al increíble desarrollo de la síntesis, la química combinatoria y los procesos biotecnológicos de fermentación microbiana. Gran parte de estos procesos son inspirados gracias al estudio y descubrimiento de



moléculas de interés en las plantas, lo que se ha convertido en una verdadera intervención para cambiar el curso de la enfermedad o para prevenir la aparición de esta (29-33). Hoy, muchas enfermedades son tratadas gracias al descubrimiento de compuestos a partir de las plantas y la malaria no es la excepción, lo que evidencia que estas juegan un papel significativo en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (34). Dentro del diseño de un nuevo fármaco, inicialmente se parte del hallazgo de un compuesto de origen natural o de síntesis orgánica con determinada actividad biológica. Esto no presupone que reúna las mejores condiciones de uso terapéutico, por lo que se utiliza como cabeza de serie o prototipo y se somete a modificaciones estructurales donde se busca optimizar la actividad terapéutica a través de avanzados conocimientos biológicos para llegar a seleccionar la nueva molécula con acción óptima (35). Estas moléculas pueden, incluso, ser visualizadas y modificadas tridimensionalmente con el fin de mejorar sus propiedades frente a la interacción con algún receptor, con la única finalidad de mejorar su potencial biológico e incluso en otros casos mejorar las propiedades de solubilidad o de formulación. Estos procesos son conocidos como farmacomodulación, que junto con las propiedades físicas, químicas y biológicas de las moléculas, permitirán predecir mediante el diseño molecular de forma cualitativa y cuantitativa (relaciones estructura-actividad, SAR y QSAR) las propiedades farmacológicas de una sustancia (36). Las plantas superiores son una fuente de millones de moléculas, con una gran variedad de estructuras diferentes que pueden presentar funciones específicas para las plantas, pero que también pueden tener actividades farmacológicas útiles para la sociedad (37). Actualmente, las nuevas tendencias en la investigación de plantas medicinales no se centran únicamente en la exploración de nuevas moléculas, sino también, en el diseño y desarrollo de fitoterapéuticos a partir de la estandarización de extractos, la cual se refiere normalmente al proceso de obtener extractos grado farmacéutico con potencial terapéutico para el desarrollo y solución de nuevas opciones terapéuticas en el tratamiento de enfermedades como la malaria, considerada un problema de salud pública en la población (38).

## 5. CONCLUSIONES

A pesar de los grandes esfuerzos por controlar la enfermedad de la malaria, aún no existen vacunas o medicamentos capaces de prevenirla, sólo existen tratamientos curativos que presentan inconvenientes como: la eficacia, la toxicidad variable y la resistencia del parásito a ellos, lo que hace que el control de la enfermedad se convierta en uno de los principales desafíos de salud pública a nivel mundial. Actualmente, el descubrimiento de nuevos blancos moleculares para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades como la malaria, también se ha determinado mediante el secuenciamiento del genoma y el proteoma de los parásitos que permiten postular nuevos modelos para el diseño de fármacos, además del desarrollo de la química combinatoria y el uso de la síntesis total de pequeñas

moléculas. Una generación de moléculas activas contra *P. falciparum*, basadas en los mecanismos de acción de los medicamentos de uso actual como la cloroquina y/o en procesos metabólicos que ocurren en el parásito están siendo sintetizadas y actualmente se encuentran en procesos de estudios clínicos fase I y II. Sin embargo, todas estas nuevas moléculas han presentado una potencial capacidad de inhibir el crecimiento del parásito en cultivo, pero varias de ellas son descartadas por sus efectos tóxicos, resistencia del parásito, pobre solubilidad y biodisponibilidad, por lo que aún se deben continuar la búsqueda de nuevos antimaláricos que permitan su uso combinado con otros medicamentos.

## 6. REFERENCIAS

1. Robert A, Dechy-Cabaret O, Cazelles J, Benoit-Vical F, Meunier B. Recent Advances in Malaria Chemotherapy. Journal of the Chinese Chemical Society 2002;49: 301-310.
2. Botero D, Restrepo M, 1998. Parásitos humanos. 3ª edición. Medellín: CIB.
3. López, F. Diagnóstico de Malaria. OPS, 1988.
4. Olumese P. Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization, 2006.
5. WHO, World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases 1996.
6. Drug resistance in malaria, WHO 2001.
7. Gelb M. Drug discovery for malaria: a very challenging and timely endeavor. Current Opinion in Chemical Biology 2007, 11:440-445.
8. "IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change 2007". Disponible en: <http://www.ipcc.ch/>
9. OMS, 2016. Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/es/> ( 16 de Junio de 2016).
10. Raheem I.T.; Goodman S.N.; Jacobsen E.N. Catalytic asymmetric total syntheses of quinine and quinidine. Journal of the American Chemical Society. 2004, 126: 706-707.
11. Disponible en: <http://www.pharmacy.wsu.edu/History/history24.html> ( 25 de abril 2012)
12. Leete E. Biosynthesis of quinine and related alkaloids. American Chemical Society. Accounts of chemical research. 1969, 2: 59-64.
13. Brown S.T, King T.J, Hasenkamp R, and Thompson R.H. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1976, 1: 1165-1170.
14. Stock G, Niu D, Fujimoto RA, Koft ER, Balkovec, Tata JR, et al., The first stereoselective total synthesis of Quinine. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123: 3239-3242.
15. Seeman J.I.. The Woodward-Doering/Rabe-Kindler Total Synthesis of Quinine: Setting the Record Straight History of Chemistry. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 1378 – 1413.
16. Woodward R. B., and W. E. Doering. The total synthesis of quinine. J. Am. Chem. Soc. 1944, 66 (5): 849-849.

17. Vipan K, Aman M, Kelly C. Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarials natural products. *Bioorganic and medicinal chemistry*. 2009, 17: (6): 2236-2275.
18. Goodman & Gilman's: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th edn. 1996.
19. WHO, World Health Organization . Division of Control of Tropical Diseases 1996.
20. Tang and Eisenbrand. *Chinese Drugs of Plant Origin*. Eds., Springer-Verlag, Berlin. 1992, pp. 161-175.
21. Carbonara T; Pascale R; Argentieri M; *et al.*, Phytochemical analysis of a herbal tea from *Artemisia annua* L. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2012, 62: 79-86.
22. Richard K. H., Sanjeev K. Artemisinin: activities and actions. *Microbes and infection*. 2007, (6): 1339-1346.
23. Tang, W. and Eisenbrand G. *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional & Modern Medicine*. NY: Springer Verlag. Berlin. 1992, 161-175.
24. Vangapandu S, Jain M, Kaur K, Patil P, Patel S, Jain R. Recent Advances in Antimalarials Drug Development, *Medicinal Research Reviews*. 2007, 27(1): 65-107.
25. Guía WHO 2010, 2ª Edición.
26. International Artemisinin Study Group. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *The Lancet*. 2004, January 3; 363: 9-17.
27. Noedl H, Se Y, Schaecher K, *et al.*, Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008, 359: 2619–20.
28. Herwig Frans. The pharmaceutical death-ride of Dihydroartemisinin. *Malaria Journal*. 2010, 9:212.
29. Newman DJ and Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012; 75(3):311-35.
30. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep*. 2000; 17:215-234.
31. Newman DJ, Cragg GM, and Snade KM J. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod*. 2003; 66: 1022-1037.
32. Newman DJ. and Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Natural Products*. 2007; 70: 461-477.
33. Newman DJ. and Cragg GM. Natural Products of Therapeutic Importance. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*. 2010 ; 3: 135–175.
34. Yang Y, Xi-Qiang L, Chun-Ping T, Sheng Y. Natural products chemistry research 2010's progress in China. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2012; 10(1): 1-12.
35. Paterson I and Anderson EA. The renaissance of natural products as drug candidates. *Science*. 2005; 310:451-453.
36. Dewick P. *Medicinal Natural products: A biosynthetic Approach*. Suxxes, United Kingdom: John Wiley & Sons, 2009.
37. Nicolaou K and Montagnon T. *Molecules that changed the world*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH, 2008.
38. Hostettmann K, Mahabir G, Marston A, Ferreira E. *Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos*. Bogotá, Colombia: Programa iberoamericano de Ciencia y Tecnología. Cyted; Convenio Andrés Bello, 2008.



## Sepsis biomarkers: A review

**Title in Spanish:** *Biomarcadores empleados en sepsis: Un review*

Ana Hernando Holgado<sup>1</sup>, Luis García de Gadiana<sup>2</sup>, Ana Fernández-Carballido<sup>1,\*</sup>, M. Dolores Albaladejo Otón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. UCM. <sup>2</sup>Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Santa Lucía.

**ABSTRACT:** Infectious diseases, such as sepsis, are a serious health problem in the world, associated with high morbidity and mortality in all areas of health care. These are time dependent diseases in which the early application of diagnostic therapeutic actions, significantly improve patient survival and prognosis. To carry out this, we have tools such as biomarkers that help us in the diagnosis and prognosis of these pathologies; There are biomarkers widely used such as PCR, Procalcitonin or cytokines, and others that are less known as pro-adrenomedullin (pro-ADM), soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1), soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (SuPAR), Pancreatic Stone Protein (PSP) or sCD25.

**RESUMEN:** Las enfermedades infecciosas, como la sepsis, constituyen un grave problema de salud en el mundo, asociándose con una elevada morbilidad y mortalidad en todos los ámbitos de la asistencia sanitaria. Se trata de enfermedades tiempo dependientes en las que la aplicación precoz de una serie de medidas diagnóstico terapéuticas mejoran de forma significativa la supervivencia y el pronóstico del paciente. Para ello se disponen de herramientas como los biomarcadores que nos ayudan tanto en el diagnóstico como pronóstico de estas patologías; biomarcadores clásicos y ampliamente utilizados como la PCR, procalcitonina o citocinas y otros menos conocidos como presepsina, *pro-adrenomedulina* (pro-ADM), *soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1* (sTREM-1), *soluble urokinase-type plasminogen activator receptor* (suPAR), *Pancreatic Stone Protein* (PSP) o sCD25.

\*Corresponding Author: [afernand@ucm.es](mailto:afernand@ucm.es)

Received: April 6, 2017 Accepted: May 7, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 2 (2017), pp. 175-187

Language of Manuscript: Spanish

### 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen un grave problema de salud en el mundo, asociándose con una elevada morbilidad y mortalidad en todos los ámbitos de la asistencia sanitaria (1). De entre ellas, la sepsis forma parte del grupo de enfermedades tiempo dependiente, entendiéndose como tales aquellas en las que el retraso diagnóstico terapéutico influyen negativamente en la evolución del proceso y por tanto la aplicación precoz de una serie de medidas diagnóstico terapéuticas, entre las que se incluyen la terapia antibiótica y el soporte hemodinámico adecuado, mejoran de forma significativa la supervivencia y el pronóstico del paciente.

Para el diagnóstico de estas patologías nos podemos ayudar de pruebas microbiológicas, pero, las propias características de estas pruebas suponen una limitación para un diagnóstico rápido, porque la obtención de resultados no es inmediata y además, estas pruebas pueden estar condicionadas por la toma previa de antibióticos (2).

Por ello, la disponibilidad de otras herramientas, como los marcadores bioquímicos, probablemente en combinación con criterios clínicos, es esencial en la toma

de decisiones ante este tipo de pacientes, al tratarse la sepsis de una patología tiempo-dependiente y en la que la rápida identificación del proceso, la administración de la terapia antibiótica adecuada, así como la categorización de la severidad como base para la toma de decisiones diagnóstico-terapéuticas, son necesarias en el manejo de esta patología, de manera que los retrasos en la administración de los antibióticos o de otras medidas terapéuticas puede modificar sustancialmente el pronóstico de los pacientes (3).

Un marcador bioquímico es un producto sanitario para el diagnóstico *in vitro*, definiéndose producto sanitario como todo aquel material que consista en un reactivo, producto reactivo, calibrador, material de control, estuche de instrumental y materiales, instrumento, aparato, equipo o sistema, utilizado solo o en asociación con otros, destinado por el fabricante a ser utilizado *in vitro* para el estudio de muestras procedentes del cuerpo humano, incluidas las donaciones de sangre y tejidos, sólo o principalmente con el fin de proporcionar información: relativa a un estado fisiológico o patológico, o relativa a una anomalía congénita, o para determinar la seguridad y compatibilidad con receptores potenciales, o para

supervisar medidas terapéuticas (4).

Por otro lado, se define como biomarcador a aquella molécula medible en una muestra biológica de forma objetiva, sistemática y precisa, cuyos niveles se constituyen en indicadores de que un proceso es normal o patológico y sirven para monitorizar la respuesta al tratamiento (5) (6) (7). El biomarcador debe proporcionar información adicional a la que se obtiene con los datos clínicos del paciente y ayudar a la hora de tomar decisiones urgentes en los SUH (8).

Al biomarcador ideal, que no existe, se le debería reconocer y exigir capacidad para:

- Establecer un diagnóstico precoz (incluso antes de que se manifiesten los signos y síntomas de una infección bacteriana grave como hipotensión, hiperlactacidemia o disfunción de órganos). Por lo tanto, aumentará la seguridad y acortará el tiempo del diagnóstico clínico de la infección/sepsis, permitiendo el inicio más precoz de las medidas terapéuticas adecuadas (5) (9) (10).
- Cuantificar la gravedad y estratificar el riesgo, identificar a los pacientes con infección/sepsis con la máxima sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo (VPP), y descartar los casos con riesgo de mala evolución (como en el caso de bacteriemia) con la mayor especificidad y valor predictivo negativo (VPN) (6) (8).
- Monitorizar la evolución de la infección bacteriana y su respuesta al tratamiento, de forma que sirva de guía para la terapia antibiótica (indicación, cese o cambio del antibiótico) (8) (11).

Existen numerosos biomarcadores empleados con esta finalidad; los más empleados en la práctica clínica, quizás porque tienen la ventaja de estar automatizados son la PCR (proteína C reactiva), PCT (procalcitonina) y citocinas.

## 2. BIOMARCADORES

Se han publicado diversos estudios relacionados con la sepsis y los diferentes biomarcadores empleados para su diagnóstico (12) (13) (14), más que en ninguna otra patología; Quizás esto se deba a la complejidad de la fisiopatología de la sepsis, en la que intervienen numerosos mediadores inflamatorios, además de otros mecanismos fisiopatológicos (15).

Una de las revisiones más recientes y completas es la de Pierrakos y cols, que analizaron todos los estudios realizados hasta el año 2010, incluyendo 3370 artículos con un total de 178 biomarcadores, número que probablemente se haya incrementado en los últimos seis años (16):

Los biomarcadores PCR y PCT están ampliamente implantados en la práctica clínica, incluso su medición fue recogida en la definición de sepsis del 2001. Otros marcadores han sido y siguen siendo evaluados para su utilización en el manejo de los pacientes con sospecha de infección; de entre ellos, los más descritos son: presepsina, *pro-adrenomedulina* (pro-ADM), *soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1* (sTREM-1), *soluble*

*urokinase-type plasminogen activator receptor* (suPAR) (17), *Pancreatic Stone Protein* (PSP) o sCD25.

### 2.1. Biomarcadores clásicos

#### 2.1.1. Citocinas

Las citocinas, también llamadas citoquinas, son proteínas responsables de la comunicación intercelular, activando receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, etc. Son producidas por diferentes tipos celulares, mayoritariamente los linfocitos y macrófagos activados (18).

Su acción principal consiste en la regulación del mecanismo de la inflamación, ya que hay citocinas pro-inflamatorias y otras de carácter anti-inflamatorio.

Se trata de proteínas de bajo peso molecular, que fueron descubiertas en la década de los 60-70 (19).

Hay más de 100 tipos, cada una de ellas con una acción específica, aunque citocinas diferentes comparten funciones similares. Es difícil clasificarlas, pero se podrían agrupar en 4 grupos funcionales, de acuerdo al sitio o fase específica de la respuesta inmune en la que actúen (20):

- Citocinas pro-inflamatorias: Actúan en la respuesta inmune innata, inespecífica o inflamación. Son interleucina-1 (IL-1), Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-8 (IL-8), interleucina-12 (IL-12), interleucina-16 (IL-16) e interferones.
- Citocinas que favorecen el desarrollo de inmunidad celular y/o citotóxica: Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2).
- Citocinas que favorecen la producción de las diversas clases de inmunoglobulinas o inmunidad humoral: interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13), Factor Inhibitorio de Leucemias (LIF), Oncostatin M (OSM)...
- Citocinas con funciones extra-inmunológicas y/u homeostáticas: interleucina-3 (IL-3), factor estimulante de monocitos y granulocitos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO)...

Durante la inflamación e infección, los niveles de estas citocinas aumentan en suero, por lo que diferentes estudios han publicado su posible utilidad como biomarcadores para la identificación de la infección/sepsis. Así, por ejemplo, la IL-8 puede identificar infecciones severas en pacientes neutropénicos (21), o la IL-6 elevada sugiere una aparición rápida de un shock séptico (22)(23).

Las limitaciones principales de las citocinas son su inespecificidad, ya que su secreción es dependiente del proceso inflamatorio, y su cinética, dado que la precocidad en alcanzar su concentración máxima limita su uso en la práctica clínica. Tanto el TNF como las IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 tienen una rápida respuesta y alcanzan su máximo nivel a las 2-3 h. Además, estas moléculas tienen poca bioestabilidad y semivida corta, por lo que podrían escapar fácilmente a una sola determinación, limitando su utilidad en los SUH (8).

En la práctica clínica solo la IL-6 ha tenido cierta

implantación en el diagnóstico de la sepsis neonatal tardía (24).

### 2.1.2. PCR

Es una proteína plasmática no glicosilada de síntesis hepática, que se produce en respuesta a un estímulo inflamatorio en el organismo. Pertenece a la familia de las pentraxinas y está formada por cinco subunidades idénticas unidas por enlaces no covalentes; cada subunidad está formada por 206 aminoácidos (25). El papel fisiológico de esta proteína podría estar mediado por su unión a la fosfocolina, que está presente en la superficie de las células muertas y en algunos tipos de bacterias, con la

finalidad de activar en el organismo el sistema del complemento, promoviendo una respuesta antiinflamatoria y apoptótica (26)(27).

Su mecanismo de acción exacto *in vivo* no se conoce completamente, pero juega un papel importante en los procesos de defensa no específicos.

Es un importante marcador de fase aguda, formando parte de la respuesta inmunitaria innata. Su concentración puede aumentar hasta 50.000 veces en las 24-48 horas siguientes a la producción del daño tisular, con un inicio de su aumento a las 6 horas (Figura 1).

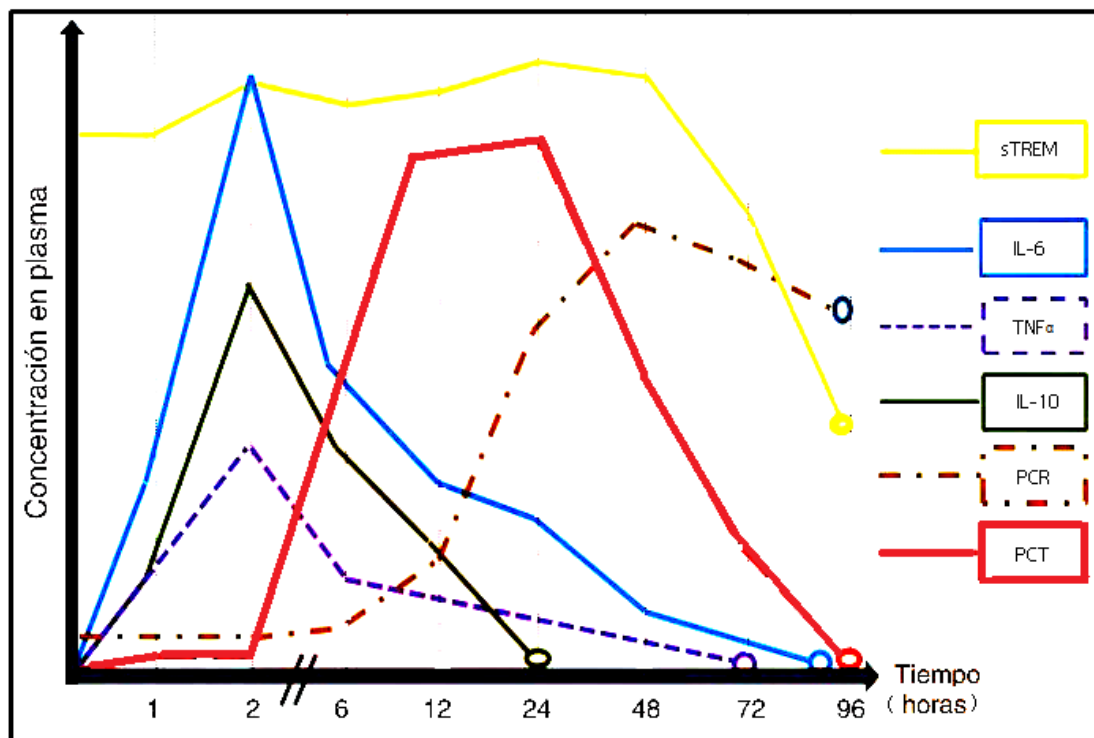


Figura 1. Cinética de los biomarcadores de sepsis. Imagen adaptada de Julián Jiménez y cols. (28)

A nivel clínico, la PCR se usa como marcador de inflamación y puede servir para determinar el progreso de una enfermedad o la efectividad de un tratamiento.

Son numerosas las limitaciones de la PCR como marcador de infección/sepsis:

1. Las concentraciones varían según la edad y el estado fisiológico (Tabla I).
2. Se trata de un marcador con especificidad limitada, ya que hay pacientes no infectados con valores de PCR muy elevados, como en el caso del paciente crítico (30).

3. Su cinética es más variable y lenta que la de la PCT (hasta 24 horas después) (31), pudiendo estar elevada incluso cuando la infección está remitiendo, lo que la hace que la PCT la esté relegando (8).

A pesar de sus limitaciones, y probablemente por motivos más relacionados con la tradición que con la medicina basada en la evidencia, sigue siendo un marcador ampliamente utilizado en nuestro país, como demuestra el estudio de Salinas y cols (32).

**Tabla I: Concentraciones de PCR según edad y estado fisiológico (29)**

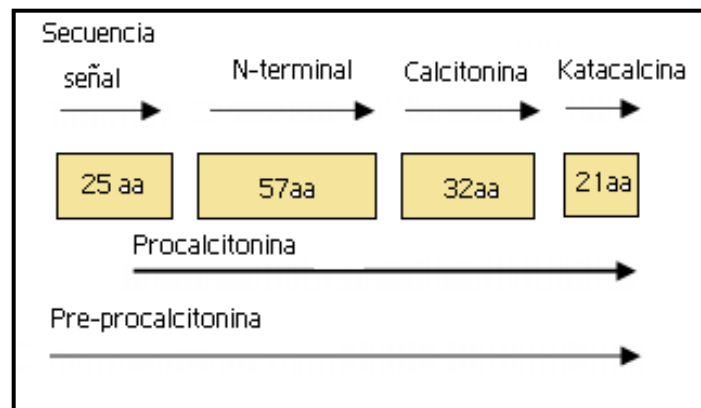
Situación	Niveles séricos (mg/L)
• Adultos sanos	<1
• Vejez	<2
• Embarazadas	
• Inflamación leve	1-4
• Infecciones virales	
• Inflamación activa	
• Infección bacteriana	4-20
• Infecciones bacterianas severas	>20
• Quemaduras	
• Sepsis	>50

### 2.1.3. PCT

La PCT es un péptido de 116 aminoácidos, precursor de la calcitonina, hormona que está relacionada con la regulación del metabolismo cálcico (Figura 2).

Procede del gen CALC-I que da lugar al *calcitonin gene related peptide* (CGRP) en las células del sistema nervioso central y a la pre-pro-calcitonina en las células C

del tejido tiroideo. Dicha pro hormona procede de la escisión de la pre-pro hormona en condiciones normales, en las células C de la glándula tiroides, que dará lugar a la hormona activa finalmente. Sin embargo, en las infecciones severas existe una síntesis en tejidos extratiroideos, generalmente en el sistema mononuclear fagocítico (33).



**Figura 2: Estructura de la PCT.**

Una de las principales ventajas de este marcador es su cinética, que permite una identificación más precoz del paciente infectado. Es rápida, con una respuesta inicial al estímulo de unas 2-6 h, con niveles máximos a las 8 h, que se mantienen estables hasta las 24 h y descienden hasta valores normales en 72-96 h (28), tal y como se observa en la Figura 1. La molécula es muy estable tanto *in vitro* como *in vivo*.

Algunos estudios describen la PCT como un marcador de alta especificidad para infección (34) y sepsis (35) (36). Se ha descrito que el incremento de su concentración en sangre apoya el diagnóstico diferencial de etiología bacteriana (37) y es indicativo de la severidad de la enfermedad (38).

El proceso de secreción de la PCT se muestra en la Figura 3.



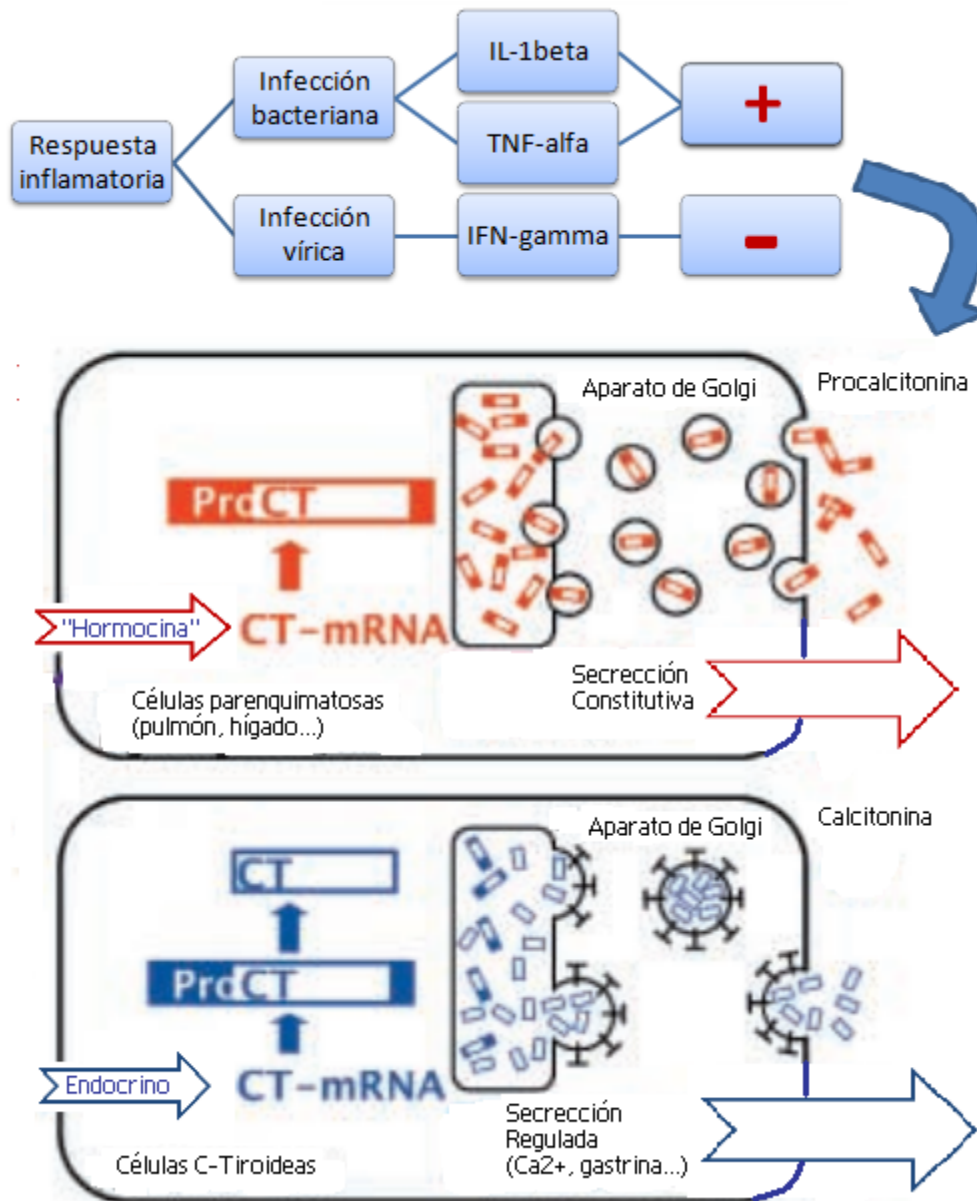


Figura 3. Proceso de liberación de la PCT. Imagen adaptada de Linscheid y cols. (39).

La función exacta de este biomarcador es todavía objeto de estudio en las fases de sepsis e infección, planteándose diferentes hipótesis, como si actúa en el metabolismo fosfocálcico, aunque se apuesta más por su posible intervención en la síntesis del óxido nítrico, que es el responsable de la hipotensión que aparece durante la

sepsis (40).

Sin embargo, la PCT también presenta limitaciones. En la tabla II se describen las principales causas de falsos positivos y falsos negativos descritos en la literatura (41)

**Tabla II: Causas de falsos positivos y negativos de la PCT (41).**

Falsos positivos	Falsos negativos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los recién nacidos (fisiológicamente) los primeros días de vida</li> <li>• Síndrome de distress respiratorio</li> <li>• Infecciones agudas por <i>Plasmodium falciparum</i>.</li> <li>• Infecciones micóticas sistémicas (candidiasis, aspergilosis...)</li> <li>• Traumatismos mecánicos graves</li> <li>• Traumatismos quirúrgicos</li> <li>• Administración de anticuerpos monoclonales o policlonales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Curso temprano de la infección</li> <li>• Infecciones localizadas</li> <li>• Endocarditis subaguda</li> </ul>
<p>antitiroglobulina</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rechazo de trasplantes</li> <li>• Neumonitis química</li> <li>• Quemaduras graves y golpes de calor</li> <li>• Pacientes con cáncer medular de tiroides, de pulmón de células pequeñas, o tumores con producción de hormonas paraneoplásicas</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fiebre mediterránea familiar (elevada producción de citoquinas)</li> <li>• Tratamiento del melanoma con TNF<math>\alpha</math></li> </ul>	

Existen cinco tipos de ensayos de medida, cuatro cuantitativos (inmunoluminométrico, inmunofluorescente, electroquimioluminiscencia e inmunoturbidimetría) y otro semicuantitativo (inmunocromatografía).

#### 2.1.3.1. Biomarcadores emergentes

Aunque son muy numerosos los biomarcadores evaluados con fines diagnósticos y pronósticos en el contexto de la infección/sepsis, a continuación se describen aquellos de los que se dispone ya de métodos automatizados que facilitan su introducción en la práctica clínica.

##### 2.1.3.1.1. Presepsina (sCD14-ST)

Se trata de una glicoproteína, presente en la membrana de los macrófagos, monocitos, neutrófilos, condrocitos, células B, células dendríticas, fibroblastos gingivales, queratinocitos humanos y líneas de células epiteliales

intestinales.

Sirve como receptor específico de alta afinidad para los LPS, presentes en la pared celular de las bacterias Gram negativas, y otros productos bacterianos, como los peptidoglucanos de las Gram positivas. Tal y como se muestra en la figura 4, el complejo LPS-LBP se une al receptor CD14 y activa al receptor TLR4, con la consecuente liberación de citocinas e interleucinas que provocan la cascada inflamatoria contra los agentes infecciosos. El complejo LPS-LBP-CD14 se libera a la circulación sanguínea, y por acción de ciertas enzimas se separa el CD14 del resto del complejo, generándose el sCD14, que es el fragmento soluble del CD14. Este fragmento, por acción de proteasas, se fracciona, dando lugar al sCD14-ST (sCD14 subtipo), que se conoce como presepsina (42).



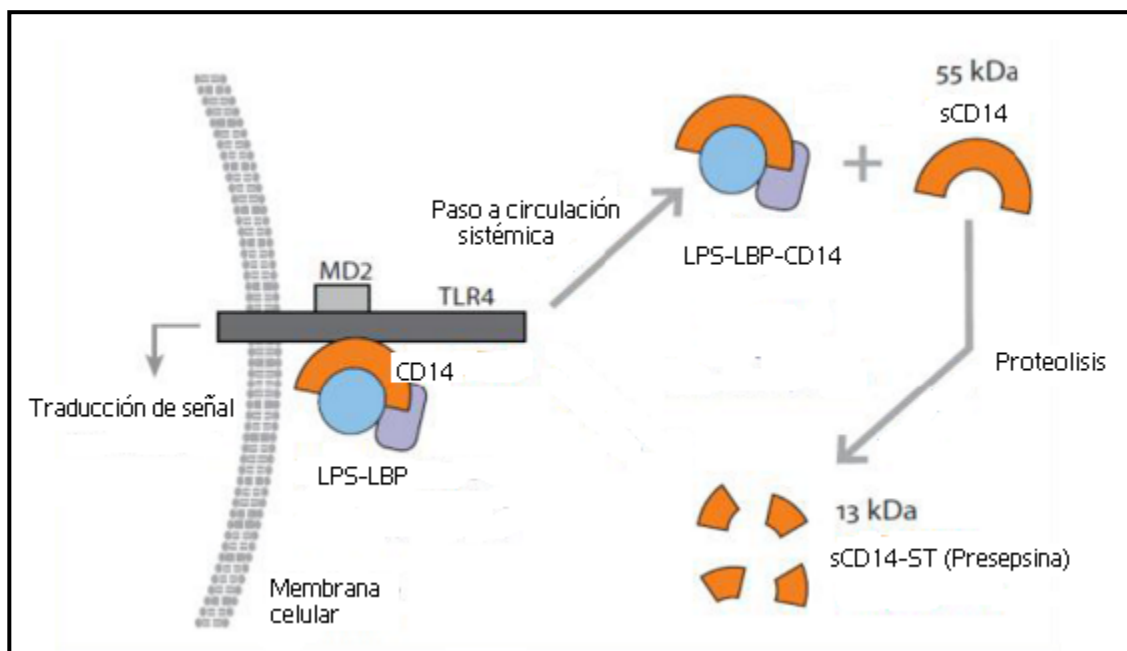


Figura 4. Activación de la presepsina. Imagen adaptada de Liu y cols (43).

La presepsina es el fragmento N-terminal de 13KDa de la glicoproteína CD14, y está formada por 64 aminoácidos (43).

Diversos estudios sugieren una correlación

significativa entre las puntuaciones de APACHE II, índice de severidad de la enfermedad y valores de presepsina, cuyos puntos de corte preliminares los sitúan según la siguiente tabla (Tabla III) en (44)(45):

Tabla III. Valores de corte de la presepsina.

Punto de corte	Severidad de la enfermedad
<200 pg/mL	Exclusión de sepsis e infección
<300 pg/mL	Exclusión de sepsis severa o shock séptico
>300 pg/mL	Posible sepsis
>1000 pg/mL	Alta probabilidad de sepsis severa o shock séptico.

Tiene una cinética de inicio al estímulo a las 2 h, con incrementos con cierta lentitud y el pico se presenta a las 24 h.

Este biomarcador inicialmente se medía por un método ELISA, pero esto requería un pretratamiento de la muestra que duraba entre 5-6 horas, lo que impedía dar un resultado rápido al clínico en los Servicios de Urgencias. Actualmente se ha optimizado la técnica y se mide mediante el analizador *Pathfast*, que es un sistema de inmunoanálisis de quimioluminiscencia rápido (15 minutos), que utiliza sangre entera o plasma (EDTA o heparina) (46)(47) y permite su uso en la cabecera de paciente.

El papel de la presepsina como marcador diagnóstico de infección/sepsis en el contexto del paciente con sospecha de infección atendido en un SU es en la actualidad controvertido, con estudios que muestran resultados contradictorios respecto a sus posibles ventajas en comparación a la PCT.

#### 2.1.3.1.2. MR-Proadrenomedulina (Pro-AMP)

La adrenomedulina (ADM) es un péptido de 52 aminoácidos, que forma un anillo de 6 residuos aminoácidos y una tirosina C-terminal (48). Tiene actividad inmunomoduladora, metabólica y vasodilatadora y fue aislada inicialmente en biopsias de feocromocitomas humanos.

Forma parte de la superfamilia de los péptidos de la calcitonina, ya que comparte un gen común, por lo que su estructura es similar. El gen de la ADM se localiza en el brazo corto del cromosoma 11. El precursor de la ADM es la pre-pro-ADM, con 185 aminoácidos, y mediante su escisión se genera un péptido de 164 aminoácidos que es la pro-ADM. A su vez, éste péptido genera dos péptidos activos, la ADM y el péptido N-terminal de la proadrenomedulina (PAMP) y una región medial sin actividad biológica, que se conoce como la región medial de la pro-ADM (MR-pro-ADM) (49) y es la que se cuantifica en plasma; Se describe en la Figura 5.

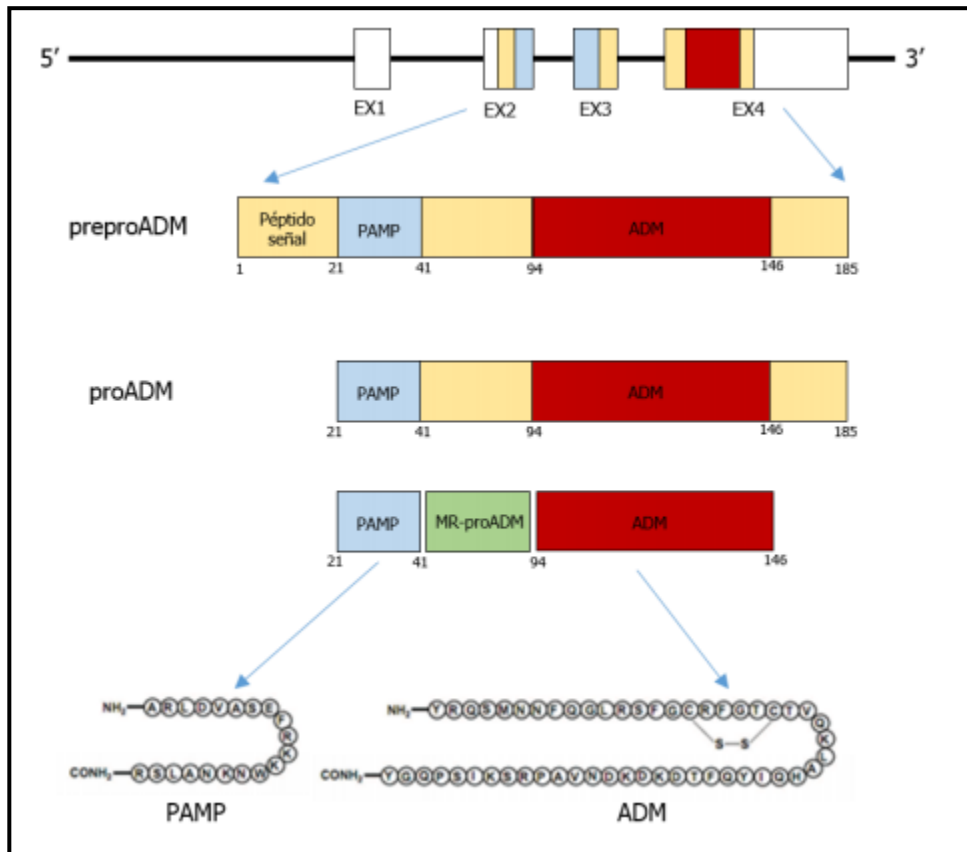


Figura 5. Fracciones de ADM. Imagen adaptada de Hinson y cols. (50).

En contraste con lo que se pensaba inicialmente, el gen de la ADM se localiza en numerosos tejidos como: el pulmonar, renal, cardíaco, adiposo y neuronal. La síntesis de esta molécula está estimulada por la presencia de citoquinas inflamatorias, toxinas bacterianas, hormonas y factores de crecimiento (51).

El mecanismo de acción de la ADM consiste en su unión al receptor de membrana del tejido correspondiente, activando una cascada de segundos mensajeros.

Ya que se trata de un marcador de amplia distribución tisular, sus niveles aumentan en numerosos procesos patológicos, como alteraciones cardíacas (infartos, enfermedades cerebrovasculares, hipertensión), pulmonares (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma), renales (insuficiencia renal, glomerulonefritis) y tumorales, entre otros (50). Pero también se eleva en procesos infecciosos independientemente de la etiología de origen (bacteriana, viral o fúngica), siendo en dichos procesos en los que se han descrito niveles más altos de ADM.

Sin embargo, su semivida (unos 22 minutos) (52), y los métodos disponibles para su medición (técnicas de radioinmunoensayo), limitan su posible utilidad como biomarcador en un laboratorio de urgencias (53).

Años después se ha identificado la MR-pro-ADM, que es la fracción medial del precursor de la ADM, que no tiene función biológica conocida, pero se excreta en relación 1/1 con la ADM, lo que, junto con su mayor

estabilidad en suero, hace más útil esta fracción para su uso en la práctica clínica.

En cuanto a su utilización como biomarcador de sepsis y predictor de mortalidad causada por ella, hay estudios con conclusiones divergentes (54) (55)(56). Hay autores que han descrito una buena correlación entre los niveles de Pro-ADM al ingreso de los pacientes sépticos y la mortalidad asociada (55)(54). Sin embargo, otros concluyen que a pesar de mostrar rendimientos adecuados no mejoran el que alcanzan las escalas de gravedad y disfunción orgánica aunque los resultados no son malos, no mejoran ni las escalas de gravedad ni el rendimiento de marcadores que ya se emplean, como por ejemplo la PCT, desaconsejando así su uso en la práctica clínica.

La medida de pro-ADM presenta una excelente correlación con la gravedad de la enfermedad, con el riesgo de desarrollar complicaciones adversas y con la mortalidad a corto y medio plazo por infecciones en el tracto respiratorio inferior, incluyendo una de las causas principales de consulta en los SUH, la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), especialmente cuando se combina con escalas de evaluación del riesgo, como el índice de gravedad de neumonía (PSI) y CURB-65 para la NAC (57)(58).

Más recientemente la medida al ingreso y seriada de MR-proADM ha demostrado su utilidad en el paciente crítico con SG y SS para el diagnóstico de sepsis y como predictor de mortalidad en pacientes con sepsis grave, mejorando incluso el rendimiento de la PCT (59) (60).

#### 2.1.3.1.3. *S-TREM 1 ( Soluble-Triggering receptor expressed on myeloid cells 1)*

Se trata de unos receptores que pertenecen a la familia de las gammaglobulinas. Se localizan en la membrana celular de neutrófilos y monocitos maduros y su expresión se induce intensamente en respuesta a una infección bacteriana o fúngica (61). Su activación interviene en la cascada de acontecimientos que caracterizan al SRIS.

Lo que se mide es la fracción soluble s-TREM 1 (62), que ha sido evaluada en numerosos estudios como posible biomarcador en el diagnóstico de los procesos infecciosos y sépticos (63).

Diferentes estudios realizados muestran diferentes resultados acerca de su valor pronóstico según las concentraciones iniciales de dicho marcador, aunque todos coinciden en su valor diagnóstico (64)(65)(66).

No obstante también se ha visto elevado en patologías no infecciosas como las vasculitis, gastritis, pancreatitis y metástasis de tumores sólidos (27).

También puede ser medido en líquidos biológicos como los lavados broncoalveolares, líquido cefalorraquídeo... (67).

#### 2.1.3.1.4. *suPAR (soluble urokinase-type plasminogen activator receptor)*

Es un receptor integral de membrana con una estructura secundaria, formada por 3 alfa hélices y 17 beta láminas anti paralelas, formando 3 dominios homólogos, DI, DII y DIII (68)

El suPAR es la forma soluble del uPAR, que es el receptor activador del plasminógeno de tipo uroquinasa. Se trata de un receptor que se expresa en varios tipos de células incluyendo neutrófilos, linfocitos, monocitos/macrófagos, células endoteliales y tumorales. Tras la liberación de la membrana puede encontrarse en el plasma o en otros fluidos biológicos (69).

Su activación conlleva diversas funciones inmunológicas, que incluyen la adhesión celular, migración, quimiotaxis, proteólisis, activación inmune, remodelación del tejido, invasión y transducción de señales (70).

La concentración de suPAR se correlaciona positivamente con el nivel de activación del sistema inmune, sin embargo, se ha visto que durante las infecciones bacterianas, en donde hay una estimulación leucocitaria por parte de la infección, sí que se elevan los

niveles de suPAR, pero estas elevaciones no son tan significativas como las de la PCT o PCR, lo que lleva a pensar, que la liberación de este marcador no está tan fuertemente inducida por las endotoxinas bacterianas, como ocurre con la PCT y la PCR (71).

Hay numerosos estudios, que al igual que ocurre con el s-TREM 1, muestran diferentes resultados, contradictorios en cuanto a su utilidad diagnóstica y pronóstica (72).

Entre los nuevos biomarcadores emergentes se encuentran la PSP (Pancreatic Stone Protein) y el sCD25 (CD25 soluble). Son marcadores biológicos de nueva aparición, que en estudios realizados en los últimos años han demostrado su utilidad en el diagnóstico y pronóstico de la sepsis en el contexto de los Cuidados Intensivos (73)(74),(75),(76). Sin embargo, el comportamiento de los biomarcadores varía en función del contexto en el que estos son utilizados (77).

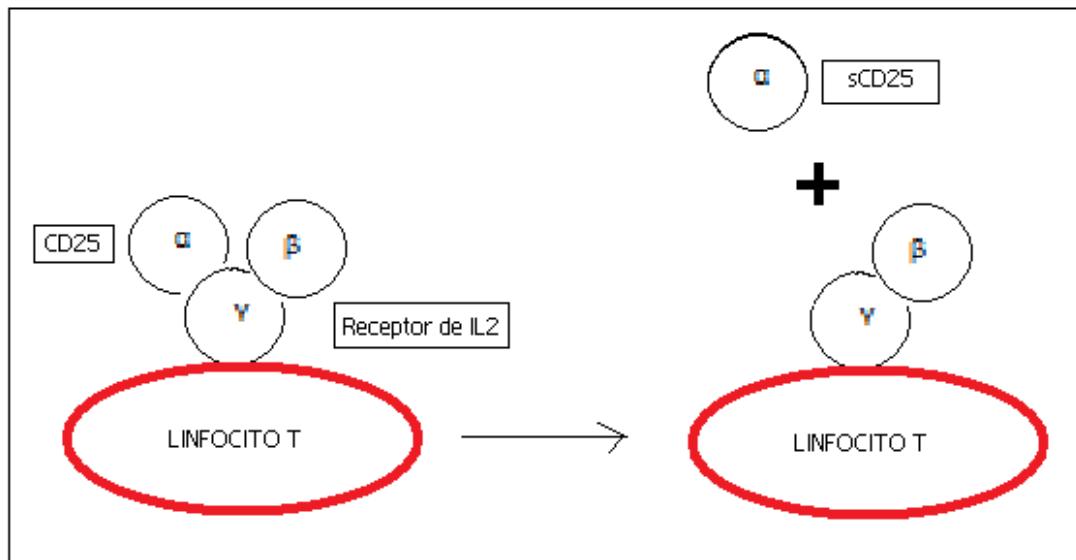
#### 2.1.3.1.5. *Pancreatic Stone Protein (PSP)*

También es conocida como Proteína Regeneradora 1-alfa (PSP/reg) o litostatina. Se trata de un polipéptido de 16kDa, que pertenece a la familia de las proteínas de unión a la lecitina (78) y es secretado por las células acinares pancreáticas y las células Paneth intestinales en respuesta al estímulo de citocinas (79). Aunque su función exacta no está aún definida (80), parece tener funciones protectoras mediante la promoción de las respuestas proliferativas celulares durante los procesos de regeneración de las células beta y la reparación epitelial (81) interviniendo también como inhibidor de la precipitación del carbonato cálcico en el jugo pancreático (82), evitando así los cálculos a este nivel.

Se ha visto que aumenta en los casos de pancreatitis aguda y crónica, insuficiencia renal crónica, procesos gastrointestinales malignos (83), y también en aquellos procesos patológicos traumáticos que desarrollan sepsis (84), participando de esta manera en la predicción de la misma y de la asociada a fallo orgánico (85).

#### 2.1.3.1.6. *CD25 soluble (sCD25)*

El sCD25 se sabe que se genera como resultado de la escisión proteolítica a partir de las células T activadas. CD25 es la cadena alfa del receptor de IL-2, y el sCD25 es una parte de esta molécula, pero más estable, con mayor vida media y por lo tanto más recomendable para su cuantificación (Figura 6)



**Figura 6. Proceso de escisión del sCD25.**

Se expresa constitutivamente en las células T reguladoras, y también sobre las células T efectoras después de su activación, pudiendo reflejar el desarrollo de una respuesta regulatoria compensatoria (86). Se ha utilizado ampliamente como biomarcador que refleja las enfermedades inflamatorias y tumores caracterizados por la expansión de las células T (87), pero aún se desconoce si estos niveles aumentados desempeñan un papel directo en estas patologías (88).

Por otro lado, se ha visto que este marcador está presente en procesos infecciosos de carácter séptico (89).

### 3. CONCLUSIONES

Existe una amplia literatura sobre los biomarcadores empleados en el diagnóstico y manejo de la sepsis, sin embargo, ninguno de ellos tiene una sensibilidad y especificidad suficientemente adecuada para ser empleado en la práctica clínica como gold estándar. Los biomarcadores más utilizados a nivel clínico siguen siendo la PCR y la PCT, pero estos también presentan limitaciones a la hora de diagnosticar pacientes con infección.

Dada la complejidad de la patología infecciosa, podría decirse que una combinación de varios biomarcadores mejoraría el diagnóstico de estos pacientes, pero se requieren más estudios para dicha evaluación.

### 4. REFERENCIAS

1. Gutiérrez Macías A, Martínez Ortiz de Zárate M. Infecciones en urgencias. Nuevos retos para el siglo XXI. *Emergencias*. 2000;12:77–8.
2. Zárate MMO De, Castillo JG Del, Jiménez AJ, Salmerón PP, Roca FL, Tey JMG, et al. Estudio INFURG-SEMES: epidemiología de las infecciones atendidas en los servicios de urgencias hospitalarios y evolución durante la última década. *Emergencias* 2013; 25: 368-378. 2013;25(5):368–78.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D,

- Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012.
4. BOE. Real decreto 1662/2000, de 29 de septiembre, sobre productos sanitarios para diagnóstico “in vitro.” *Boletín Of del Estado*. 2009;núm. 268,:109761–75.
5. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. 2010; *Crit Care* 2010; 14(1):R15
6. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:89–95.
7. Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation*. 2007;115(8):949–52.
8. Julián-Jiménez A. Biomarcadores de infección en urgencias: ¿cuáles pueden ser útiles? *Emergencias*. 2012;24:343–5.
9. González-Castillo J, Candel FJ, Julián-Jiménez A. Antibióticos y el factor tiempo en la infección en urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(3):173–80.
10. Letham K, Gray A. El objetivo de las 4 horas (4-hour target) en los servicios de urgencias del National Health Service: un comentario crítico. *Emergencias Rev la Soc Española Med Urgencias y Emergencias*. 2012; 24:69-72.
11. Tudela P, Prat C, Lacoma A, Mòdol JM, Domínguez J, Giménez M, et al. Biomarcadores para la predicción en urgencias de infección bacteriana, bacteriemia y gravedad. *Emergencias*. 2012;24(5):348–56.
12. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016; 23:353-73.
13. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 2013; 369(9):840–51.
14. Tupchong K, Koymfman A, Foran M, Levy MM, al. et,

- Angus DC, et al. Sepsis, severe sepsis, and septic shock: A review of the literature. *African J. Emerg. Med.* 2015; 5:127–35.
15. Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, Cook DJ, Rubenfeld G, Foster D, et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit. Care Med.* 2003; 31:1560–7.
  16. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010;14(1):2-18.
  17. Henríquez-Camacho C, Losa J. Biomarkers for sepsis. *Biomed. Res. Int.* 2014;2014:e547818 6páginas.
  18. Abbas N, Bednar I, Mix E, Marie S, Paterson D, Ljungberg A, et al. Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. *J Neuroimmunol.* 2002; 126:50–7.
  19. Jamilloux Y, Bourdonnay E, Gerfaud-Valentin M, Py BF, Lefeuvre L, Barba T, et al. Interleukin-1, inflammasome and autoinflammatory diseases. *Rev. Med. Interne.* 2016; 16:30472-6
  20. Guzmán B, Correa D, Caballase E, Calderón C. Citocinas y otras moléculas involucradas en sepsis y en pacientes con sepsis y complicaciones de neutropenia. *Alergia, Asma r Inmunología Pediátricas.*2004; 13(1):15-23.
  21. Damas P, Canivet JL, de Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, et al. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit. Care Med.* 1997; 25:405–12.
  22. Rintala E, Pulkki K, Mertsola J, Nevalainen T, Nikoskelainen J. Endotoxin, interleukin-6 and phospholipase-A2 as markers of sepsis in patients with hematological malignancies. *Scand. J. Infect. Dis.* 1995; 27: 39–43.
  23. Barriere SL, Lowry SF. An overview of mortality risk prediction in sepsis. *Crit. Care Med.* 1995; 23:376–93.
  24. Cernada M, Roqués V, Vento M. Interleuquina-6 y diagnóstico de sepsis neonatal: algunas matizaciones. *Anales de Pediatría.* 2010;73(2):104-105.
  25. Khialani AD, Espinosa MR. Proteína C reactiva y enfermedad cardiovascular. *Ed Cont Lab Clín.* 13:59–75.
  26. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* 1999;7(2):169–77.
  27. Colmenero AM, Pablo LR De, Nieto P, Martín S, Sierra D, Mateos LS, et al. Apuntes de Ciencia MARCADORES DE SEPSIS: SITUACIÓN ACTUAL. 2014;1–13.
  28. Julián-Jiménez A, Candel-González FJ, González Del Castillo J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32:(3) 177–90.
  29. Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *J. Emerg. Med.* 1999; 17:1019–25.
  30. GP C. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2004;8(4):234–42.
  31. Rey Galán C. Biomarcadores de infección bacteriana grave: ¿ayudan en la práctica clínica? *An Pediatría.* 2016; 84: 247–8.
  32. Salinas La Casta M, López Garrigós M, Uris Selles J, Leiva Salinas C. Variabilidad en la oferta y en la solicitud de determinaciones de laboratorio en pacientes de servicios de urgencias hospitalarios. *Emergencias Rev. Soc. Española Med. Urgencias y Emergencias.* 2014; 26: 450-8.
  33. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet.* 1993: 341: 515–8.
  34. Domínguez-Comesaña E, López-Gómez V, Estevez-Fernández SM, Mariño Padín E, Ballinas-Miranda J, Carrera-Dacosta E, et al. Procalcitonin and C-reactive protein as early indicators of postoperative intra-abdominal infection after surgery for gastrointestinal cancer. *Cirugía española.* 2014;92(4):240–6.
  35. Meisner, M, Tschaikowsky, K, Schmidt J et al. Procalcitonin (PCT)—Indications for a new diagnostic parameter of severe bacterial infection and sepsis in transplantation, immunosuppression and cardiac assist devices. *Cardiovasc. Eng.* 1996;1:67.
  36. Brunkhorst FM, Forycki ZF, Beier W et al. Procalcitonin immunoreactivity in severe human shock. *Int Care Med.* 1995;21(Suppl 1):12.
  37. Hedlund J, Hansson LO. Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: Correlation with etiology and prognosis. *Infection.* 2000;28(2):68–73.
  38. Ma J, Wang S, Chen D, Duan J, Li C, Li G. The prognostic value of serum procalcitonin on severity of illness in non-sepsis critically ill patients. 2016: 28:688–93.
  39. Linscheid P, Seboek D, Nylen ES, Langer I, Schlatter M, Becker KL, et al. In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology.* 2003; 144: 5578–84.
  40. Prat Aymerich C, Domínguez Benitez J. Procalcitonina y marcadores de infección. *Ed. Cont. Lab. Clín.* 2004;7:38–43.
  41. Christ-Crain M, Müller B. Procalcitonin in bacterial infections--hype, hope, more or less? *Swiss Med. Wkly.* 2005: 135: 451–60.
  42. Masahira K, Gaku T, Naoya M, Tomohiro K. Serum levels of soluble CD14 subtype reflect the APACHE II and SOFA Scores. *Med Postgraduates.* 2010;48(1):46–50.
  43. Liu B, Chen Y-X, Yin Q, Zhao Y-Z, Li C-S.

- Diagnostic value and prognostic evaluation of Presepsin for sepsis in an emergency department. *Crit Care*. 2013; 17: R244.
44. Miyata M, Sato N, Takahashi. The utility of the soluble CD14 subtype for diagnosis of sepsis, the examination of the simple diagnostic kit. *J Iwate med Assoc*. 2007;59:325–31.
  45. García de Guadiana L, Esteban P, Viqueira M, Jiménez R, Hernando A, Ortín A et al. Diagnostic accuracy of presepsin (soluble CD14 subtype) for prediction of bacteremia in patients with systemic inflammatory response syndrome in the Emergency Department. *Clin Biochem*. 2014; 47: 505–8.
  46. Kweon OJ, Choi JH, Park SK, Park AJ. Usefulness of presepsin (sCD14 subtype) measurements as a new marker for the diagnosis and prediction of disease severity of sepsis in the Korean population. *J. Crit. Care*. 2014; 29:965–70.
  47. Sato M, Takahashi G, Shibata S, Onodera M, Suzuki Y, Inoue Y, et al. Clinical Performance of a New Soluble CD14-Subtype Immunochromatographic Test for Whole Blood Compared with Chemiluminescent Enzyme Immunoassay: Use of Quantitative Soluble CD14-Subtype Immunochromatographic Tests for the Diagnosis of Sepsis. *PLoS One*. 2015; 10: e0143971.
  48. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto K, Ichiki Y, Nakamura S, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;192:553–60.
  49. Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, et al. Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;203:631–9.
  50. Hinson JP, Kapa S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 2000;21:138–67.
  51. Cases A, Mora-Macia J. Adrenomedullin: a new vasoactive peptide. *Nefrologia*. 2001;21:16–25.
  52. Ornan DA, Chaudry IH, Wang P. Saturation of adrenomedullin receptors plays an important role in reducing pulmonary clearance of adrenomedullin during the late stage of sepsis. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1586:299–306.
  53. Lewis LK, Smith MW, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Adrenomedullin(1-52) measured in human plasma by radioimmunoassay: plasma concentration, adsorption, and storage. *Clin Chem*. 1998;44:571–7.
  54. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Müller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care*. 2005;9(6):816–24.
  55. Guignant C, Voirin N, Venet F, Poitevin F, Malcus C, Bohé J, et al. Assessment of pro-vasopressin and pro-adrenomedullin as predictors of 28-day mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009; 35:1859–67
  56. Suberviola B, Castellanos-Ortega A, Ruiz Ruiz A, Lopez-Hoyos M, Santibañez M. Hospital mortality prognostication in sepsis using the new biomarkers suPAR and proADM in a single determination on ICU admission. *Intensive Care Med*. 2013; 39: 1945–52.
  57. Cavallazzi R, El-Kersh K, Abu-Atherah E, Singh S, Loke YK, Wiemken T, et al. Midregional proadrenomedullin for prognosis in community-acquired pneumonia: A systematic review. *Respir. Med*. 2014; 108: 1569–80.
  58. España PP, Capelastegui A, Mar C, Bilbao A, Quintana JM, Diez R, et al. Performance of pro-adrenomedullin for identifying adverse outcomes in community-acquired pneumonia. *J. Infect*. 2015; 70: 457–66
  59. Andaluz-Ojeda D, Cicuéndez R, Calvo D, Largo E, Nogales L, Muñoz MF, et al. Sustained value of proadrenomedullin as mortality predictor in severe sepsis. *J. Infect*. 2015; 71: 136–9.
  60. Valenzuela Sanchez F, Valenzuela Mendez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez Gutierrez J, Jaen Franco M, González García M, et al. Diagnostic and prognostic usefulness of Mid-Regional Pro-Adrenomedullin levels in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med. Exp*. 2015; 3: A306.
  61. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature*. 2001; 410: 1103–7.
  62. Gibot S, Massin F. Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells 1: an anti-inflammatory mediator? *Intensive Care Med*. 2006; 32: 185–7.
  63. Jiyong J, Tiancha H, Wei C, Huahao S. Diagnostic value of the soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in bacterial infection: a meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2009;35(4):587–95.
  64. Latour-Pérez J, Alcalá -López A, García-García MA, Sánchez-Hernández JF, Abad-Terrado C, Viedma-Contreras JA, et al. Valor pronóstico de los niveles plasmáticos de sTREM-1 en pacientes con sepsis: Un estudio de cohortes. *Med Intensiva*. 2010;34(4):231–6.
  65. Gibot S, Cravoisy A, Kolopp-Sarda M-N, Béné M-C, Faure G, Bollaert P-E, et al. Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis. *Crit. Care Med*. 2005; 33:792–6.
  66. Phua J, Koay ESC, Zhang D, Lee KH. How well do serum sTREM-1 measurements prognosticate in septic shock? *Anaesth. Intensive Care*. 2008; 36:654–8.
  67. Valor diagnóstico de la inmunoglobulina sTREM-1 en la neumonía de los pacientes ventilados mecánicamente. *Med Intensiva*. 2004; 28: 386–9.
  68. Thunø M, Macho B, Eugen-Olsen J. suPAR: the molecular crystal ball. *Dis Markers*. 2009; 27: 157–72.

69. Ploug M, Rønne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Danø K. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosylphosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 1926–33.
70. Eugen-Olsen J. suPAR - a future risk marker in bacteremia. *J Intern Med.* 2011;270(1):29–31.
71. de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, Struck J, Morgenthaler NG, Papassotiropoulos J, et al. The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. *Intensive Care Med.* 2008; 34: 518–22.
72. Gustafsson A, Ljunggren L, Bodelsson M, Berkestedt I. The prognostic value of suPAR compared to other inflammatory markers in patients with severe sepsis. *Biomark Insights.* 2012; 7: 39–44.
73. Schlapbach LJ, Graf R, Woerner A, Fontana M, Zimmermann-Baer U, Glauser D, et al. Pancreatic stone protein as a novel marker for neonatal sepsis. *Intensive Care Med.* 2013;39(4):754–63.
74. Yu D, Kim J, Park C, Park J. Serial Changes of CD4 + CD25 + FoxP3 + Regulatory T Cell in Canine Model of Sepsis Induced by Endotoxin. *J Vet Med Sci.* 2014;25:4–7.
75. Matera G, Puccio R, Giancotti A, Quirino A, Pulicari M, Zicca E, et al. Impact of interleukin-10, soluble CD25 and interferon- $\gamma$  on the prognosis and early diagnosis of bacteremic systemic inflammatory response syndrome: a prospective observational study. *Crit Care.* 2013; 17(2): R64.
76. Keel M, Härter L, Reding T, Sun L-K, Hersberger M, Seifert B, et al. Pancreatic stone protein is highly increased during posttraumatic sepsis and activates neutrophil granulocytes. *Crit. Care Med.* 2009; 37(5): 1642–8.
77. Schuetz P, Müller B. Procalcitonin in critically ill patients: time to change guidelines and antibiotic use in practice. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(7): 758–60.
78. Rass AA, Talat MA, Arafat MA, El-Saadany HF, Amin EK, Abdelsalam MM, et al. The Role of Pancreatic Stone Protein in Diagnosis of Early Onset Neonatal Sepsis. *Biomed. Res. Int.* 2016; 1035856.
79. Keim V, Iovanna JL, Dagorn JC. The acute phase reaction of the exocrine pancreas. Gene expression and synthesis of pancreatitis-associated proteins. *Digestion.* 1994; 55(2): 65–72.
80. Llewellyn MJ, Berger M, Gregory M, Ramaiah R, Taylor AL, Curdt I, et al. Sepsis biomarkers in unselected patients on admission to intensive or high-dependency care. *Crit. Care.* 2013; 17:R60.
81. Graf R, Schiesser M, Reding T, Appenzeller P, Sun L-K, Fortunato F, et al. Exocrine meets endocrine: pancreatic stone protein and regenerating protein--two sides of the same coin. *J. Surg. Res.* 2006; 133(2): 113–20.
82. Jin CX, Hayakawa T, Ko SBH, Ishiguro H, Kitagawa M. Pancreatic Stone Protein/Regenerating Protein Family in Pancreatic and Gastrointestinal Diseases. *Intern Med.* 2011;50:1507-16.
83. Motoo Y, Satomura Y, Mouri I, Mouri H, Ohtsubo K, Sakai J, et al. Serum levels of pancreatitis-associated protein in digestive diseases with special reference to gastrointestinal cancers. *Dig. Dis. Sci.* 1999; 44(6): 1142–7.
84. Keel M, Härter L, Reding T, Sun L-K, Hersberger M, Seifert B, et al. Pancreatic stone protein is highly increased during posttraumatic sepsis and activates neutrophil granulocytes\*. *Crit. Care Med.* 2009; 37(5): 1642–8.
85. Que YA, Delodder F, Guessous I, Graf R, Bain M, Calandra T, et al. Pancreatic stone protein as an early biomarker predicting mortality in a prospective cohort of patients with sepsis requiring ICU management. *Crit. Care.* 2012; 16(4): R114.
86. Taylor AL, Llewellyn MJ. Superantigen-Induced Proliferation of Human CD4+CD25- T Cells Is Followed by a Switch to a Functional Regulatory Phenotype. *J. Immunol.* 2010; 185(11): 6591–8.
87. Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann. Intern. Med.* 1990; 113(8): 619–27.
88. Russell SE, Moore AC, Fallon PG, Walsh PT. Soluble IL-2R $\alpha$  (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice. *PLoS One.* 2012; 7(10): e47748.
89. Saito K, Wagatsuma T, Toyama H, Ejima Y, Hoshi K, Shibusawa M, et al. Sepsis is characterized by the increases in percentages of circulating D4+CD25+ regulatory T cells and plasma levels of soluble CD25. *Tohoku J. Exp. Med.* 2008; 216(1): 61-8.







## Colorectal cancer: prevention and treatment

**Title in Spanish:** *Cancer colorrectal: prevención y tratamiento*

Julia Sánchez Gundín<sup>1,2</sup>, Ana Isabel Torres Suárez<sup>2,3,\*</sup>, Ana María Fernández Carballido<sup>2,3</sup>, Lidia Martínez Valdivieso<sup>1</sup>, Dolores Barreda Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultativo Especialista de Área, Farmacia Hospitalaria. Hospital Virgen de la Luz, Hermandad de Donantes de Sangre, S/N, 16002 Cuenca (España). <sup>2</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (España). <sup>3</sup>Instituto de Farmacia Industrial. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (España).

**ABSTRACT:** Colorectal cancer (CRC) is one of the most commonly diagnosed cancers in the world, it is the third most prevalent tumor and the fourth cause of death. CRC can be classified as sporadic (90-95 %) or hereditary and it has a mortality rate of 19.6 per 100,000 inhabitants and an incidence rate of 46.4 per 100,000 inhabitants. Several risk and protective factors have been described according CRC, some independent of the patients' life-style, especially genetic factors, and others dependent on it, such as diet, obesity, physical activity, tobacco and alcohol. CRC screening tests are one of the causes involved in the reduction of mortality and the incidence of CRC, because they involve CRC detection in non-advanced stages that allow the disease to be treated in the early stages, providing better predictions. After the diagnosis of CRC, it is necessary to know the staging of the tumor in order to be able to use the best possible chemotherapy regimen. Adjuvant chemotherapy is used after curative surgery, mainly in patients with CRC in stage II with high risk and stage III (locally advanced tumors). Patients with stage IV tumors (metastatic tumor) benefit from neoadjuvant chemotherapy, which is previously administered to the surgical intervention in order to reduce the tumor. These treatment regimens are based on combinations of chemotherapy and molecular targeted therapies.

**RESUMEN:** El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los cánceres más comúnmente diagnosticados a nivel mundial, constituyendo el tercer tumor de mayor incidencia y la cuarta mayor causa de muerte. El CCR puede clasificarse como esporádico (90-95 %) o hereditario y presenta una tasa de mortalidad de 19,6 por cada 100.000 habitantes y una tasa de incidencia de 46,4 por cada 100.000 habitantes. Son varios los factores de riesgo y protectores del CCR que se han descrito, algunos independientes del tipo de vida de los pacientes, sobre todo factores genéticos, y otros dependientes del mismo, como son la dieta, la obesidad, la actividad física, el consumo de tabaco y de alcohol. Las pruebas de cribado del CCR son una de las causas implicadas en la reducción de la mortalidad y de la incidencia del CCR, pues suponen una detección de CCR en estadios no avanzados que permiten afrontar la enfermedad en etapas tempranas proporcionando así mejores pronósticos. Tras el diagnóstico de CCR hay que conocer la estadificación del mismo para poder emplear el mejor esquema de quimioterapia posible. La quimioterapia adyuvante se emplea tras la intervención quirúrgica con carácter curativo, principalmente en pacientes con CCR en estadios II de alto riesgo y estadio III (tumores localmente avanzados). Los pacientes con tumores en estadio IV (tumor extendido a otros órganos) se benefician de la quimioterapia neoadyuvante, administrada previamente a la intervención quirúrgica con el fin de reducir el tumor. Estos esquemas de tratamiento se basan en combinaciones de quimioterapia y terapias dirigidas.

\*Corresponding Author: galaaaa@ucm.es

Received: April 23, 2017 Accepted: May 7, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 2 (2017), pp. 188-199

Language of Manuscript: Spanish

### 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los cánceres más comunes en todo el mundo con aproximadamente un millón de personas diagnosticadas anualmente (1). El CCR es el tercer cáncer más común diagnosticado en todo el mundo para ambos sexos, con una incidencia ligeramente superior en los hombres, después del cáncer de pulmón y cáncer de mama, y la cuarta mayor causa de muerte,

después del cáncer de pulmón, cáncer de hígado y cáncer de estómago (2). Sin embargo, la incidencia del CCR presenta una marcada variación geográfica (región con tasa más baja: África Central, 2,3 por cada 100.000 habitantes y región con tasa más alta: Japón, 49,3 por cada 100.000 habitantes) y una marcada variación según el desarrollo económico del país que se trate (dos tercios de todos los CCR diagnosticados se encuentran en países

desarrollados) (3). Concretamente en España, el CCR es el tumor maligno de mayor incidencia para ambos sexos, con 41.441 nuevos casos anuales y afectará a uno de cada 20 hombres y a una de cada 30 mujeres antes de cumplir los 74 años (4).

## 2. CLASIFICACIÓN

El CCR puede clasificarse como esporádico o hereditario. Se cree que más del 90-95% de estas neoplasias son esporádicas (3) y un 5-10% parecen tener un componente hereditario, cuyas subclases principales son dos trastornos autosómicos dominantes: poliposis adenomatosa familiar y CCR hereditario no asociado a poliposis, también conocido como Síndrome de Lynch (1).

Se cree que los CCR esporádicos surgen de:

- **Pólipos adenomatosos (adenomas):** son la vía principal (dos tercios) de desarrollo y progresión del CCR, pero sólo un pequeño porcentaje de ellos se convierten realmente en carcinoma. Además tienen diferentes patrones de crecimiento (5):

- *Tubular:* subtipo más frecuente. Pequeños pólipos adenomatosos.

- *Mixto tubulovelloso:* mezcla de ambos patrones de crecimiento, tubular y velloso.

- *Velloso:* adenomas de mayor tamaño, con mayor probabilidad de desarrollar neoplasia maligna.

- **Lesiones dentadas:** implican 3 tipos de pólipos, raramente malignos (6, 7):

- *Pólipos hiperplásicos* (28-42% de todos los pólipos detectados): más comunes en hombres y localizados principalmente en colon distal y recto.

- *Adenomas serrados* (9%): mayor prevalencia en mujeres de aproximadamente 60 años.

- *Adenomas dentados tradicionales* (1%): sin distinción sexual con mayor prevalencia en edades medianas cercanas a los 60 años.

- **Pólipos inflamatorios:** asociados a personas con enfermedad inflamatoria intestinal.

## 3. LOCALIZACIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL

Loupakis *et al.* (8) publicaron un interesante artículo donde se evaluó la ubicación del tumor primario en pacientes con CCR. Sugirieron que el CCR proximal en la flexión esplénica tenía mayor mortalidad que el CCR distal en la flexión esplénica. Otro hallazgo importante fue la asociación entre el CCR derecho y la quimiorresistencia, debido a una supervivencia libre de progresión (SLP) significativamente mayor en pacientes con tumores en el

lado izquierdo (8). Estos datos hacen hincapié en que el CCR derecho e izquierdo tiene diferencias biológicas importantes y pueden deberse a perfiles biomoleculares distintos y específicos en función de la ubicación del tumor primario, con un posible mejor impacto en el pronóstico y en el beneficio del tratamiento en paciente con CCR izquierdo. Se sabe que el desarrollo embriológico del intestino distal, el ciego, el colon ascendente, la flexura hepática del colon y los dos tercios proximales del colon transverso se originan en el intestino medio, mientras que el tercio distal de la flexura transversal y esplénica, el colon descendente, el colon sigmoide y el recto derivan del intestino posterior.

Del mismo modo, el *Cancer Genome Atlas Network* llevó a cabo un gran análisis a escala genómica de las muestras de CCR, que reveló diferencias biológicas significativas entre los CCR del lado derecho y los CCR del lado izquierdo, siendo en el lado derecho más frecuentemente hipermetilados e hipermutados (9). Otros datos de una gran cohorte de pacientes con CCR mostraron claramente que los CCR de lado derecho y de lado izquierdo se caracterizan por características clínicas, patológicas y moleculares específicas, identificando más de 1.000 genes expresados de manera diferente entre los dos sitios anatómicos (10). Además, las células epiteliales colorrectales están constantemente en contacto con el contenido intestinal, lo que podría desempeñar un papel crítico en la transformación celular y en el desarrollo y en la progresión del tumor. Los contenidos intestinales (residuos de alimentos, microbiota y productos de fermentación bacteriana) y sus interacciones con las células del huésped (células epiteliales e inmunitarias) pueden implicar directamente cambios moleculares celulares o, alternativamente, pueden influir diferencialmente en la evolución tumoral de acuerdo con características moleculares en neoplasias de células malignas (11). Los contenidos intestinales cambian gradualmente a lo largo de los diferentes sitios intestinales, y este hecho puede explicar por qué motivo las características moleculares del tumor cambian gradualmente a lo largo de los mismos. Además, el CCR derecho tiene una tasa más alta de comorbilidades como anemia, perforación intestinal y obstrucción que los tumores del lado izquierdo (10).

## 4. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL

El sistema de estadificación más utilizado es el del *American Joint Committee on Cancer*, también conocido como el sistema TNM, descrito en las tablas 1 y 2 (12).

**Tabla 1. Clasificación TNM del carcinoma colorrectal.**

<i>T: tumor primario</i>	
<b>Tx</b>	El tumor primario no puede ser evaluado.
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario.
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia.
<b>T1</b>	El tumor invade la submucosa.
<b>T2</b>	El tumor invade la muscular propia.
<b>T3</b>	El tumor invade la subserosa o tejidos pericólicos o perirrectales no peritonizados.
<b>T4a</b>	El tumor invade el peritoneo visceral.
<b>T4b</b>	El tumor invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras.
<i>N: ganglios linfáticos</i>	
<b>Nx</b>	Los ganglios regionales no pueden ser evaluados.
<b>N0</b>	No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales.
<b>N1</b>	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales.
<b>N1a</b>	Metástasis en 1 ganglio linfático regional.
<b>N1b</b>	Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales.
<b>N1c</b>	Depósitos del tumor en la subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirrectales no peritonizados, sin metástasis ganglionar regional.
<b>N2</b>	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.
<b>N2a</b>	Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales.
<b>N2b</b>	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales.
<i>M: metástasis</i>	
<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia.
<b>M1</b>	Metástasis a distancia.
<b>M1a</b>	Metástasis limitada a un solo órgano o sitio (por ejemplo, hígado, pulmón, ovario o ganglio no regional).
<b>M1b</b>	Metástasis en más de un órgano o sitio del peritoneo.

**Tabla 2. Estadios anatómicos/grupos pronósticos.**

<i>Estadio</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>IIIC</b>	T4b	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3-T4b	N2b	M0
	T4a	N1-N2	M0
<b>IVA</b>	Any T	Any N	M1a
<b>IVB</b>	Any t	Any N	M1b

El estadio es el principal factor pronóstico. En resumen:

- *Estadio 0 o carcinoma in situ*: es la fase más temprana del CCR. Las células tumorales se encuentran situadas en la parte más superficial de la mucosa y en ningún caso la traspasa. No afecta a ganglios linfáticos.
- *Estadio I*: el tumor afecta a la pared del colon o recto sin traspasar la capa muscular. No existe afectación de ganglios linfáticos.
- *Estadio II*: el tumor ha infiltrado todas las capas de la pared del colon o recto. Puede invadir los órganos de alrededor. No se aprecia afectación ganglionar.
- *Estadio III*: el tumor ha invadido los órganos más próximos y afecta a los ganglios linfáticos.
- *Estadio IV*: el tumor se ha diseminado afectando a órganos alejados del colon o recto como hígado, pulmón, ovario o ganglio no regional.

## 5. MORTALIDAD E INCIDENCIA

El CCR tiene una tasa de mortalidad de aproximadamente 19,6 por cada 100.000 habitantes y una tasa de incidencia de aproximadamente 46,4 por cada 100.000 habitantes (13). Ambas tasas han ido cayendo en los últimos años debido al diagnóstico en un estadio temprano gracias al conocimiento de los factores de riesgo, las pruebas de cribado colorrectal y la mejora en el abordaje terapéutico. Concretamente en España, la supervivencia a los 5 años se sitúa en este momento por encima de la media de los países europeos, con un 64 %, mientras que la media europea es de un 57 % (4, 14).

## 6. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CÁNCER COLORRECTAL

Los factores de riesgo asociados al CCR se pueden dividir en independientes y dependientes, como se describe en la Tabla 3: factores de riesgo independientes y factores de riesgo dependientes.

**Tabla 3. Factores de riesgo asociados al cáncer colorrectal.**

<b><i>Factores de riesgo independientes</i></b>	<b><i>Factores de riesgo dependientes</i></b>
Edad mayor de 50 años.	Dietas ricas en carnes rojas y alimentos procesados.
Antecedentes personales de pólipos colorrectales o CCR.	Inactividad física.
Antecedentes personales de enfermedad inflamatoria intestinal.	Obesidad.
Antecedentes familiares de pólipos adenomatosos o CCR.	Tabaco.
Síndromes hereditarios como: - Poliposis adenomatosa familiar. - CCR hereditario no asociado a poliposis o syndrome de Lynch. - Síndrome de Turcot. - Síndrome de Peutz-Jeghers. - Poliposis asociada al gen MUTYH.	Ingesta de alcohol.
Procedencia afro-americana.	
Judíos procedentes de la Europa del Este.	
<i>Diabetes Mellitus tipo 2.</i>	

6.1. *Factores de riesgo independientes*: aproximadamente el 5-10 % de los CCR se deben a defectos genéticos (15). Entre estas enfermedades se encuentran:

✓ *Poliposis adenomatosa familiar*. Enfermedad hereditaria autosómica dominante caracterizada por la aparición de un gran número (más de 100) de pólipos de tipo adenomatoso en el colon y en el recto, existiendo alto riesgo de que estos adenomas puedan malignizarse. Es causada por mutaciones en el gen APC y supone alrededor del 1% de todos los CCR (15).

✓ *CCR hereditario no asociado a poliposis o syndrome de Lynch*. Enfermedad hereditaria con patrón autosómico dominante caracterizada por el desarrollo de CCR a edades más tempranas que el CCR esporádico, con predominio de localización en colon derecho y una elevada tendencia a presentar neoplasias tanto sincrónicas como metacrónicas tanto en el propio colon o recto, así como en

otros órganos (estómago, ovario, páncreas, riñón, uréteres, etc.). Se produce una mutación en la línea germinal de genes reparadores de ADN, principalmente en los genes MLH1, MSH2 y una pequeña proporción en los genes MSH6 y PMS2. Supone alrededor del 2-4% de todos los CCR (15).

✓ *Síndrome de Turcot*. También denominado “síndrome de tumor cerebral y poliposis” o “síndrome de glioma y poliposis”. Es un trastorno hereditario raro caracterizado por el desarrollo de neoplasias malignas en el sistema nervioso central asociadas a poliposis en el colon y en el recto, con pólipos que suelen ser el origen de CCR. Se han definido dos tipos de este síndrome, uno es causado por mutaciones en genes similares a los observados en la poliposis adenomatosa familiar, donde los tumores del sistema nervioso central son glioblastomas multiformes y otro que es causado por mutaciones similares a las producidas en el síndrome de

Lynch, donde los tumores del sistema nervioso central son meduloblastomas (15).

✓ *Síndrome de Peutz-Jeghers.* Enfermedad hereditaria rara que se caracteriza por la asociación de numerosos pólipos distribuidos por el aparato digestivo y zonas de pigmentación oscura en la mucosa de la boca y alrededor de los labios. Los pólipos son hamartomas y son causados por mutaciones en el gen *STK1* (15).

✓ *Poliposis asociada al gen *MUTYH*.* Enfermedad de herencia autosómica recesiva que predispone al CCR, donde se ve alterado un gen que codifica para una enzima ADN glicosilasa que repara el ADN mutado producto del daño oxidativo, de manera que la ausencia de esta enzima aumentaría la tasa de mutaciones somáticas permitiendo el desarrollo tumoral (15).

## 6.2. Factores de riesgo dependientes:

✓ *Dieta.* La inclusión de ciertos comportamientos nutricionales en los hábitos alimenticios parece estar asociada con una reducción significativa del riesgo de CCR. Algunos de estos comportamientos nutricionales son: número de comidas diarias, consumo de sal y comidas ya elaboradas o preparadas. El hábito de hacer ingestas frecuentes está relacionado con un mejor estado dietético y con un mejor control de la glucemia, mientras que el alto consumo de sal implica hipertensión, síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular, lo que conlleva una desfavorable epidemiología del CCR. Por otra parte, el uso de comidas ya elaboradas o preparadas incluye alimentos procesados a altas temperaturas (fritura, parrilla, barbacoa), que están relacionados con la formación de aminas aromáticas heterocíclicas, productos carcinógenos y mutagénicos (15). Un efecto protector contra el CCR podría ser la dieta mediterránea, que contiene (16-19):

- Elevadas proporciones de frutas, verduras, nueces, legumbres y semillas. Ricas en fibra dietética, que parece reducir el desarrollo de CCR debido a la reducción de exposición de la mucosa colónica a agentes carcinógenos. Además, la fibra vegetal sirve de sustrato a bacterias colónicas que general cadenas cortas de ácidos grasos como butirato, el cual posee una actividad anticarcinogénica (14).

- Ricas en fuentes de carbohidratos de bajo índice glucémico. Asociados con la reducción del riesgo de CCR. El factor de crecimiento insulínico tipo 1 se ha asociado con un mayor riesgo de CCR debido a que promueve la migración celular, la proliferación celular, la angiogénesis y la inhibición de la apoptosis y de la adhesión celular (20).

- Bajo consumo de carne roja. El consumo de carne roja se asocia con el desarrollo de CCR porque aumenta los niveles fecales de compuestos como N-nitroso, potencialmente cancerígeno (21).

- Consumo de aves y peces. Contienen pequeñas cantidades de micronutrientes (selenio, calcio), que se han asociado inversamente con el riesgo de CCR en algunos estudios epidemiológicos. Además, los ácidos grasos

omega-3, presentes en los peces, inhiben el crecimiento del tumor.

- Aceite de oliva. Contiene una alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico, que inhiben el desarrollo del CCR debido a la inducción de la apoptosis en las células cancerosas intestinales.

- Productos lácteos bajos en grasa.
- Rica en antioxidantes (vitamina C, carotenoides, fenoles y flavonoides). Puede estar implicado en la prevención de la iniciación y progresión del CCR y puede estar asociado con menores concentraciones plasmáticas de marcadores de inflamación y disfunción endotelial.

- Vitamina D y calcio. El aumento de la ingesta de vitamina D y calcio se han asociado con una disminución del riesgo de CCR (21).

✓ *Inactividad física.* Diferentes estudios han demostrado una relación inversa entre la actividad física y el riesgo de CCR (22), ya que el ejercicio puede prevenir el desarrollo de pólipos a CCR debido a la reducción del tiempo de tránsito gastrointestinal, que reducen la exposición de la mucosa colorrectal a carcinógenos fecales. Además, estos estudios apoyan firmemente un efecto beneficioso de la actividad física no sólo para la prevención primaria de la CCR, sino también después de su diagnóstico (23-26).

✓ *Obesidad.* Un elevado índice de masa corporal se ha asociado tanto con el desarrollo de adenomas colónicos como con el desarrollo de CCR, y hace complicada la gestión del mismo tras el diagnóstico debido a su asociación con resultados quirúrgicos deficientes (la cirugía es la modalidad de tratamiento más definitiva para CCR potencialmente curables). Además, la obesidad se asocia con síndromes metabólicos (hiperinsulinemia: implica resistencia a la insulina y niveles elevados de factor de crecimiento insulínico tipo 1) y con hipertrofia adipocitaria o acumulación excesiva de tejido adiposo (27, 28). Los adipocitos participan como mediadores centrales de la respuesta inflamatoria en individuos obesos secretando hormonas, citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento que tienen relevancia para la patogénesis del CCR. Entre las hormonas secretadas por los adipocitos, las más relevantes son la adiponectina, la leptina y la grelina, que promueven la mitosis de las células CCR, la angiogénesis y la tumorigénesis y suprimen la apoptosis de las células epiteliales del colon.

✓ *Tabaco.* En varios estudios se ha observado un aumento de varias alteraciones genéticas (mutaciones transversales) en el CCR de pacientes fumadores, asociándose el tabaquismo a un aumento del riesgo de padecer CCR (29).

✓ *Alcohol.* Existe una relación lineal entre la ingesta de alcohol y el desarrollo de CCR, de manera que ingestas superiores a 12,5-30 g de etanol al día se ha asociado con un aumento del riesgo de CCR (30, 31) pues el alcohol induce el citocromo P-450, que inhibe la desintoxicación de carcinógenos. Sin embargo, un estudio en una población mediterránea sugiere un efecto protector del

consumo moderado de alcohol en el desarrollo del CCR (32).

En lo que se refiere al desarrollo de los países, el *World Health Report* en 2015 hizo hincapié en el problema que supone el sobrepeso, tabaquismo y consumo de alcohol en los países desarrollados, contribuyendo a enfermedades como son por ejemplo el cáncer (33).

## 7. PRUEBAS DE CRIBADO DEL CÁNCER COLORRECTAL

Las pruebas de cribado del CCR es otra de las causas implicadas en la reducción de la mortalidad y de la incidencia del CCR. Tienen un papel importante no sólo en el diagnóstico, sino también en la prevención de la CCR pues implican la detección y extirpación de pólipos precancerosos, previniendo el desarrollo de tumores malignos y/o su detección en estadios precoces. El cribado de CCR tiene como público tanto a población de riesgo medio (población entre 50 y 74 años sin antecedentes familiares) (34) como población de riesgo alto (población con antecedentes familiares).

En general, las pruebas de cribado colorrectal se pueden dividir en dos grupos descritos en la tabla 4: pruebas basadas en muestras biológicas y pruebas basadas en técnicas de imagen (35).

### 7.1 Pruebas basadas en muestras biológicas:

✓ *Tests de sangre oculta en heces:* el más ampliamente usado es el test de guayaco, que se basa en la detección de la actividad peroxidasa de la hemoglobina, emitida a la luz intestinal de algunos adenomas y del propio CCR, debido a la posible ulceración y friabilidad de los mismos. Dos pequeñas muestras de heces son recogidas durante tres deposiciones consecutivas. Es un test muy barato, pero su principal limitación es su alto porcentaje de resultados falsos positivos que obliga a la realización de una colonoscopia en todos los pacientes que hayan dado positivo. La especificidad de la prueba es aproximadamente del 80%, aunque la sensibilidad es inferior. Otra limitación es las restricciones dietéticas que precisa, pues no distingue entre hemoglobina humana y no humana (34).

✓ *Tests inmunoquímicos fecales:* tienen una sensibilidad superior a los test de guayaco, pues estas técnicas incorporan métodos inmunológicos cuantitativos y cualitativos que detectan específicamente sangre humana. En cambio, presentan una baja especificidad y alto coste. Además pueden dar lugar a resultados falsos negativos en los sangrados procedentes del tracto gastrointestinal superior por el proceso de degradación de la hemoglobina en su recorrido por el tubo digestivo (34).

✓ *Tests de detección fecal de ADN humano fecal:* se basan en la detección de mutaciones del ADN en heces, que permite detectar carcinomas no sangrantes, mejorando la sensibilidad de las pruebas de sangre oculta en heces. El problema fundamental es que no existe una única diana de ADN, sino que existen múltiples alteraciones (KRAS, adenomas poliposis coli, p53, inestabilidad de mirosatélites) que deben ser chequeadas para lograr una alta sensibilidad. Además presentan el inconveniente del alto coste (35).

7.2 *Pruebas basadas en imágenes:* tienen como desventaja el alto coste, sin embargo, el ahorro de costes se consigue con la detección en estadios precoces de las neoplasias, evitando de este modo los costes derivados del uso de quimioterapia en estadios avanzados, además de la innegable ventaja en cuanto a supervivencia y calidad de vida global.

✓ *Colonoscopia:* es la mejor técnica para el cribado CCR, se considera la prueba *gold standard*. Permite la visualización de todo el colon y además de detectar neoplasias en pacientes de alto riesgo, permite en el mismo acto la resección de pólipos durante el proceso y la toma de biopsias (36), asociándose con una reducción de la incidencia de CCR en hasta un 90% (7, 37).

✓ *Sigmoidoscopia:* es de menor eficacia que la colonoscopia para la reducción de la incidencia global del CCR, puesto que sólo permite explorar hasta 60 cm, quedando parte del colon proximal sin explorar. También permite realizar polipectomía y en aquellos casos en que se detectan pólipos en la rectosigmoidoscopia, se puede completar con una colonoscopia total, incrementándose la incidencia de la detección de la neoplasia (34).

✓ *Enema opaco:* se trata de una prueba de rayos X y no hay datos científicos que avalen su eficacia como prueba en el cribado poblacional. No obstante su principal inconveniente es que el paciente tiene que someterse a una colonoscopia posterior si se identifican anomalías durante la exploración (15).

✓ *Colonoscopia virtual o colonografía por tomografía computarizada:* se trata de un examen radiológico que emplea la tomografía computarizada para obtener una visión interna del colon. Su uso es interesante en pacientes donde la colonoscopia resultase especialmente peligrosa debido a la existencia de otras patologías médicas concomitantes como pudieran ser trastornos cardiopulmonares, situaciones de anticoagulación, obstrucción intestinal, etc. El principal inconveniente es que se trata de una técnica diagnóstica y no permite la resección simultánea de los pólipos (15).

Tabla 4. Pruebas de cribado del cáncer colorrectal.

<i>Pruebas basadas en muestras biológicas</i>	<i>Pruebas basadas en imágenes</i>
Test de sangre oculta en heces.	Colonoscopia.
Tests inmunoquímicos fecales.	Sigmoidoscopia.
Tests de detección fecal de ADN humano fecal.	Enema opaco.
	Colonoscopia virtual o colonografía por tomografía computarizada.

## 8. MEJORA EN EL ABORDAJE TERAPÉUTICO DEL CÁNCER COLORRECTAL

### 8.1. Quimioterapia adyuvante

El tratamiento farmacológico del CCR ha evolucionado mucho en los últimos años. En cuanto a la *quimioterapia adyuvante*, usada tras la cirugía con la finalidad de disminuir las recidivas y aumentar la supervivencia de los pacientes, el 5-fluorouracilo (5-FU) ha sido la base del tratamiento y se ha demostrado que la adición de oxaliplatino e irinotecan a 5-FU ha aumentado la supervivencia global (SG) de 12 a aproximadamente 18 meses (38). Además, el 5-FU intravenoso puede ser sustituido por capecitabina como agente único o en combinación con oxaliplatino, con la ventaja de su administración oral y perfil de seguridad más favorable (con la excepción de una tasa relativamente más alta de eritrodismesia palmoplantar). Estos regímenes se consideran generalmente intercambiables (39) y existen varias variaciones de estas combinaciones con los acrónimos FOLFOX (5-FU + oxaliplatino), XELOX o CAPOX (capecitabina + oxaliplatino) y FOLFIRI (5-FU + irinotecan). La combinación de capecitabina + irinotecan (XELIRI) y la combinación de 5-FU + oxaliplatino + irinotecan (FOLFOXIRI) son probablemente más tóxicas (40-43).

El 5-FU se usa frecuentemente en combinación con ácido folínico (leucovorin), lo que parece potenciar los efectos inhibidores del crecimiento del 5-FU. El leucovorin puede aumentar la unión del fluorouracilo a una enzima dentro de las células cancerosas. Como resultado, el 5-FU puede permanecer en la célula cancerígena más tiempo (44).

La duración de la terapia adyuvante debe ser de 6 meses, aunque implica una cuestión importante dada la neurotoxicidad acumulada de oxaliplatino, que a veces obliga a no finalizar dicho tratamiento.

### 8.2. Cáncer colorrectal estadio I

El tumor está localizado y el tratamiento es exclusivamente quirúrgico, con excelente pronóstico tras la intervención. Estos pacientes no se benefician de la quimioterapia adyuvante.

### 8.3. Cáncer colorrectal estadio II

En particular, los pacientes diagnosticados de CCR estadio II tienen un buen pronóstico después de la resección quirúrgica curativa y no parecen beneficiarse de la quimioterapia adyuvante (45). La relación riesgo-beneficio para la quimioterapia en estos pacientes debe considerarse caso por caso y los clínicos deben basarse en el beneficio absoluto más que en las reducciones del riesgo relativo. El uso de FOLFOX es apropiado quizás para aquellos pacientes con CCR en estadio II seleccionados como de alto riesgo (46).

### 8.4. Cáncer colorrectal estadio III

Tras una cirugía con intención curativa, los pacientes con CCR estadio III, se benefician de la adición de oxaliplatino a 5-FU o a capecitabina como terapia adyuvante, con una mayor SLP para ambos regímenes [HR 0,82; IC del 95%: 0,72 a 0,93;  $p = 0,002$ ] (46) y (HR 0,80, IC del 95%, 0,69 a 0,93,  $p = 0,0045$ ) (47), respectivamente]. Capecitabina es por lo tanto una alternativa eficaz a 5-FU como terapia adyuvante (48). Además, el régimen de FOLFOX ha mostrado una tendencia al beneficio en la tasa de SG, 78,5% y 76,0% en los grupos FOLFOX y 5-FU respectivamente (HR 0,84, IC del 95%, 0,71 a 1,00;  $p = 0,046$ ) (49). En general, los beneficios de la adición de oxaliplatino son menos claros cuando el riesgo de recidiva es bajo (grado bajo, enfermedad T1/2 o N1) o alto (comorbilidades asociadas, ancianos, mal EGOG) (39). ECOG se trata de una escala desarrollada por el *Eastern Cooperative Oncology Group* con el objetivo de medir la repercusión funcional de la enfermedad oncológica en el paciente como criterio de progresión. La escala ECOG consta de 5 categorías resumidas en la tabla 5 (50, 51).

En cuanto al irinotecan, su adición a 5-FU en pacientes con CCR estadio III no demostró ventaja en SLP ni SG en estudios de fase III adyuvantes en comparación con 5-FU en monoterapia (52).

Los agentes biológicos han sido decepcionantes en los estudios adyuvantes de pacientes con CCR estadio III a pesar de su eficacia en el CCR metastásico (CCRM), como se verá a continuación.

Tabla 5. Escala ECOG.

Grade	ECOG
0	Totalmente asintomático y capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
1	Restringido en actividad físicamente extenuante pero ambulatorio y capaz de llevar cabo el trabajo de naturaleza liviana o sedentaria, p. ej., tareas domésticas livianas, trabajo de oficina.
2	Ambulatorio y capaz de todos los cuidados personales pero incapaz de llevar a cabo cualquier actividad laboral. Levantado y caminando más del 50% de las horas de vigilia.
3	Paciente capaz sólo de cuidados personales limitados; confinado a la cama o a una silla más del 50% de las horas de vigilia.
4	Completamente discapacitado. No puede llevar a cabo ningún cuidado personal. Totalmente confinado a una cama o silla.
5	Fallecido.

### 8.5. Cáncer colorrectal estadio IV

Cuando las lesiones tumorales se convierten en metastásicas, la estrategia general de tratamiento depende de si la enfermedad es reseccable o sólo es susceptible de un tratamiento paliativo. La evaluación de estos pacientes con CCRm debe ser establecida por un comité multidisciplinario, que debe determinar las metas del tratamiento: prolongación de la supervivencia, curación, mejoría de los síntomas relacionados con el tumor, detención de la progresión tumoral y/o mantenimiento de la calidad de vida.

Si la enfermedad metastásica es reseccable, la prioridad del tratamiento de primera línea es el control inmediato del tumor para mejorar los síntomas relacionados con la enfermedad, estabilizar rápidamente la enfermedad progresiva y reducir las metástasis antes de la cirugía (*quimioterapia neoadyuvante*). El tratamiento médico de CCRm implica recientemente quimioterapia en combinación con nuevas terapias dirigidas, proporcionando estos nuevos regímenes una mayor tasa de resección, mayor SLP y mejor SG (53). Hay poca diferencia en la eficacia entre FOLFOX y FOLFIRI como tratamientos quimioterápicos de primera línea y la principal diferencia entre ambos regímenes es el perfil de toxicidad; más efectos secundarios gastrointestinales, fatiga y alopecia en pacientes tratados con FOLFIRI y más trombocitopenia, neurotoxicidad y reacciones de hipersensibilidad en pacientes tratados con FOLFOX (54, 55). La elección de un régimen sobre el otro depende de factores tales como son la edad del paciente, ECOG, las comorbilidades asociadas, la preferencia del paciente y la toxicidad o disponibilidad de los fármacos. La exposición a los tres agentes citotóxicos (5-FU, oxaliplatino e irinotecan) en varias secuencias puede resultar en una supervivencia más larga.

Entre las nuevas terapias dirigidas que se usan en combinación con los esquemas de quimioterapia habría que mencionar:

- *Bevacizumab*: anticuerpo monoclonal que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (56). En cuanto al perfil de seguridad, bevacizumab presenta efectos adversos severos poco frecuentes con una toxicidad aceptable clínicamente manejable (hipertensión,

proteinuria, sangrado, tromboembolismo, perforación gastrointestinal, etc.) (57, 58).

- *Cetuximab* y *panitumumab*: anticuerpos monoclonales cuya diana específica es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (56). En cuanto a la genética, se sabe que la mutación del gen KRAS es predictivo de no respuesta al tratamiento con cetuximab y panitumumab (59, 60), pero los pacientes con mutaciones en el codón 13 del gen KRAS, que representan aproximadamente 15-20 % de todos MKRAS, parecen responder a cetuximab con una magnitud similar a los de tipo KRAS nativo (61, 62). Respecto al panitumumab, los pacientes con mutaciones en RAS y en el exón 2 de KRAS son predictivos de buenos resultados, respondiendo de manera similar que los pacientes con KRAS nativo (63). El efecto adverso más común para ambos anticuerpos son los trastornos de la piel y del tejido cutáneo, sin relacionarse muertes con dicha toxicidad (64, 65).

A pesar de los aumentos en la SLP y SG, muchos pacientes inevitablemente progresan a la primera línea de tratamiento quimioterápico, implicando el cambio a terapias de segunda línea. Para la mayoría de los pacientes la progresión después de un esquema que incluya oxaliplatino resultará en un cambio a terapia basada en irinotecán y viceversa. Como en la primera línea, los esquemas de tratamiento se basan en un régimen quimioterápico más terapias dirigidas, pudiendo ser valorados en esta línea, también fármacos como aflibercept, proteína recombinante que se une al VEGF. Este fármaco sólo presenta beneficio en asociación con el esquema FOLFIRI, presentando un perfil de seguridad relacionado con el tratamiento anti-VEGF (hipertensión, sangrado mucoso, proteinuria) (66).

El esquema de elección, dependerá como en la primera línea de varios factores como son el estadio KRAS, la edad del paciente, el ECOG, las comorbilidades asociadas, la toxicidad y la disponibilidad el fármaco.

Muchos pacientes que progresan después de todas las terapias estándar mantienen un buen ECOG y buena función orgánica, pudiendo ser candidatos a terapias adicionales como son regorafenib y TAS-102, fármacos de administración oral independientes de mutaciones en el gen KRAS. El regorafenib presenta como principales



efectos adversos eritrodisestesia palmo-plantar, hipertensión, hiperbilirrubinemia, hipofosfatemia y aumento de alanina aminotransferasa (67) y el TAS-102, principalmente neutropenia, seguido de diarrea, fatiga, náuseas (68, 69).

Por último, algunos de los pacientes con CCRm presentan una enfermedad no resecable y serán sólo candidatos a *quimioterapia paliativa*. Para estos pacientes, la quimioterapia más bevacizumab, quimioterapia más terapias EGFR dirigidas o quimioterapia sola sería una opción de tratamiento de primera línea apropiada. Los objetivos del tratamiento paliativo son la prolongación de la supervivencia, el control de los síntomas y el mantenimiento de la calidad de vida.

## 9. CONCLUSIONES

El CCR es la neoplasia más frecuente del aparato digestivo y el tercer tumor de mayor incidencia a nivel mundial. Son varios los factores de riesgo y protectores del CCR que se han descrito, algunos independientes del tipo de vida de los pacientes y otros dependientes del mismo. Las pruebas de cribado del CCR son una de las causas implicadas en la reducción de la mortalidad y de la incidencia del CCR, pues suponen una detección de CCR en estadios no avanzados que permiten afrontar la enfermedad en etapas tempranas proporcionando así mejores pronósticos. Tras el diagnóstico de CCR hay que conocer la estadificación del mismo para poder emplear el mejor esquema terapéutico posible; en los estadios I y II (tumores localizados) el tratamiento es únicamente quirúrgico y, en los casos de estadios II de alto riesgo y estadio III (tumores localmente avanzados) se complementa con quimioterapia adyuvante. Para el manejo de la enfermedad metastásica (estadio IV) se utilizan combinaciones de quimioterapia y fármacos biológicos.

## 10. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## 11. REFERENCIAS

1. Choong MK, Tsafnat G. Genetic and Epigenetic Biomarkers of Colorectal Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10(1):9-15.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86.
3. Watson AJM, Collins PD. Colon Cancer: A Civilization Disorder. *Dig Dis.* 2011;29(2):222-28.
4. Incidencia del cáncer de colon. Asociación Española Contra el Cáncer. Disponible en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdecolon/Paginas/incidencia.aspx>
5. Iravani S, Kashfi SMH, Azimzadeh P, Lashkari MH. Prevalence and Characteristics of Colorectal Polyps in Symptomatic and Asymptomatic Patients Undergoing Colonoscopy from 2009-2013. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(22):9933-37.
6. Moussata D, Boschetti G, Chauvenet M, Stroeymeyt K, Nancey S, Berger Fet al. Endoscopic and histologic characteristics of serrated lesions. *World J Gastroenterol.* 2015;21(10):2896-904.
7. Anderson JC, Shaw RD. Update on Colon Cancer Screening: Recent Advances and Observations in Colorectal Cancer Screening. *Curr Gastroenterol Rep.* 2014;16(9):403.
8. Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W et al. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(3).
9. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-37.
10. Hong Shen, Jiao Yang, Qing Huang, Meng-Jie Jiang, Yi-Nuo Tan, Jian-Fei Fu, et al. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(21): 6470-78.
11. Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, Nishihara R et al. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut.* 2012;61(6):847-54.
12. American Joint Committee on Cancer. Colon and rectum cancer staging (7<sup>th</sup> edition). Disponible en: <http://cancerstaging.org/referencestools/quickreferenc es/documents/colonmedium.pdf>
13. Jorgensen B, Knudtson J. Stop colon cancer. Colorectal Cancer Screening-Updated guidelines. *S D Med.* 2015;Spec No:82-7.
14. Viñes JJ, Ardanaz E, Arrazola A, Gaminde I. Epidemiología poblacional de Cáncer colorrectal: revisión de la causalidad. *ANALES Sis San Navarra* 2003;26(1):79-97.
15. American Cancer Society. Colorectal cancer prevention and early detection. 2014. Disponible en: <https://old.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webc ontent/003170-pdf.pdf>
16. Kontou N, Psaltopoulou T, Soupos N, Polychronopoulos E, Linos A, Xinopoulos D. The role of number of meals, coffee intake, salt and type of cookware on colorectal cancer development in the context of the Mediterranean diet. *Public Health Nutr.* 2013;16(5):928-35.
17. Genkinger JM, Koushik A. Meat Consumption and Cancer Risk. *PLoS Med.* 2007;4(12):e345.
18. Kontou N, Psaltopoulou T, Soupos N, Polychronopoulos E, Xinopoulos D, Linos A. Metabolic Syndrome and Colorectal Cancer: The Protective Role of Mediterranean Diet—A Case-Control Study. *Angiology.* 2012;63(5):390-96.
19. Schwingshackl L, Hoffmann G. Does a Mediterranean-Type Diet Reduce Cancer Risk? *Curr Nutr Rep.* 2016;5:9-17.

20. Giovannucci E. Insulin, Insulin-Like Growth Factors and Colon Cancer: A Review of the Evidence. *J Nutr*. 2001;131(11):3109–20.
21. Lee YC; Lee YL, Chiang JP, Lee JC. Differences in survival between colon and rectal cancer from SEER data. *Los One* 2013. 8(11):e78709.
22. [Slattery ML](#), [Edwards S](#), [Curtin K](#), [Ma K](#), [Edwards R](#), [Holubkov R](#), [Schaffer D](#). Physical activity and colorectal cancer. *Am J Epidemiol*. 2003;158(3):214-24.
23. [Mehta M](#), [Shike M](#). Diet and physical activity in the prevention of colorectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2014;12(12):1721-6.
24. [Rosenberg L](#), [Boggs D](#), [Wise LA](#), [Palmer JR](#), [Roltsch MH](#), [Makambi KH](#) et al. A follow-up study of physical activity and incidence of colorectal polyps in African-American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(8):1438-42.
25. Van Blarigan EL, Meyerhardt JA. Role of Physical Activity and Diet After Colorectal Cancer Diagnosis. *J Clin Oncol*. 2015;33(16):1825-34.
26. Wolin KY, Patel AV, Campbell PT, Jacobs EJ, McCullough ML, Colditz GA et al. Change in physical activity and colon cancer incidence and mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(12):3000-4.
27. [Riondino S](#), [Roselli M](#), [Palmirota R](#), [Della-Morte D](#), [Ferroni P](#), [Guadagni F](#). Obesity and colorectal cancer: role of adipokines in tumor initiation and progression. *World J Gastroenterol*. 2014;20(18):5177-90.
28. [Ma Y](#), [Yang Y](#), [Wang F](#), [Zhang P](#), [Shi C](#), [Zou Y](#) et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One*. 2013;8(1):e53916.
29. [Diergaarde B](#), [Vrieling A](#), [Van Kraats AA](#), [Van Muijen GN](#), [Kok FJ](#), [Kampman E](#). Cigarette smoking and genetic alterations in sporadic colon carcinomas. *Carcinogenesis*. 2003;24(3):565-71.
30. [Cho E](#), [Smith-Warner SA](#), [Ritz J](#), [Van den Brandt PA](#), [Colditz GA](#), [Folsom AR](#) et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med*. 2004;140(8):603-13.
31. [Fedirko V](#), [Tramacere I](#), [Bagnardi V](#), [Rota M](#), [Scotti L](#), [Islami F](#) et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann* 2011;22(9):1958-72.
32. Kontou N, Psaltopoulou T, Soupos N, Polychronopoulos E, Xinopoulos D, Linos A et al. Al Alcohol consumption and colorectal cancer in a Mediterranean population: a case-control study. *Dis Colon Rectum*. 2012 Jun;55(6):703-10.
33. World Health Organization. World Health Statistics 2015. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439_eng.pdf?ua=1&ua=1).
34. López Torres G, Hernández Carmona A. Cribado del cáncer colorrectal. *AMF* 2010;6(6):338-45.
35. Dhaliwal A, Vlachostergios PJ, Oikonomou KG, Moshenyat Y. Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: Molecular targets and perspectives. *World J Gastrointest Oncol*. 2015;7(10):178–83.
36. Singh S, Slingh PP, Murad MH, Singh H, Samadder NJ. Prevalence, Risk Factors and Outcomes of Interval Colorectal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(9):1375-89.
37. Chattree A, Lee T, Guota S, Rutter MD. Management of colonic polyps and the NHS Bowel Cancer Screening Programme. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2015;76(3):132-7.
38. Cheng Y, Yang H, Chen G, Zhang Z. Molecularly targeted drugs for metastatic colorectal cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2013;7: 1315–22.
39. Price TJ, [Segelov E](#), [Burge M](#), [Haller DG](#), [Ackland SP](#), [Tebbutt NC](#) et al. Current opinion on optimal treatment for colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013;13(5):597-611.
40. Montagnani F, Chiriatti A, Turrisi G, Francini G, Fiorentini G. A systematic review of FOLFOXIRI chemotherapy for the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: improved efficacy at the cost of increased toxicity. *Colorectal Dis*. 2011;13(8):846-52.
41. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, Polyzos A, Ziras N, Athanasiadis A et al. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Br J Cancer*. 2006;94(6):798-805.
42. Cersosimo RJ. Management of advanced colorectal cancer, Part 1. *Am J Health Syst Pharm*. 2013;70(5):395-406.
43. Cersosimo RJ. Management of advanced colorectal cancer, Part 2. *Am J Health Syst Pharm*. 2013;70(6):491-506.
44. Van der Wilt CL, Pinedo HM, Smid K, Cloos J, Noordhuis P, Peters GJ. Effect of folinic acid on fluorouracil activity and expression of thymidylate synthase. *Semin Oncol*. 1992;19(3):16-25.
45. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau Sn, Labianca R, Hamilton SR et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracilbased adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20), 3219–26.
46. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol*. 2011;29(28):3768–74.
47. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E et al. Capecitabine plus oxaliplatin

- compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1465–71.
48. Twelves C, Scheithauer W, McKendrick J, Seitz JF, Van Hazel G, Wong A et al. Capecitabine versus 5-fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy. *Ann Oncol.* 2012;23(5):1190-7.
  49. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(19):3109-16.
  50. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5(6):649-55.
  51. Nabala M, Pascual A, Llombarth A. Valoración general del paciente oncológico avanzado. Principios de control de síntomas. *Aten Primaria* 2006;38(2):21-8.
  52. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B et al. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol.* 2009;27(19):3117-25.
  53. Ribocco AS, Pino MS, Cipriani G, Marinozzi C, Fioretto L. Molecularly targeted therapy: toxicity and quality of life considerations in advanced colorectal cancer. [Expert Rev Anticancer Ther.](#) 2013;13(10):1181-91.
  54. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N et al. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 2005; 23(22):4866-75.
  55. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004;22(2):229-37.
  56. Fichas técnicas. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=buscar>
  57. Puthillath A, Patel A, Fakhri MG. Targeted therapies in the management of colorectal carcinoma: role of bevacizumab. *Onco Targets Ther.* 2009;2: 1–15.
  58. Qu CY, Zheng Y, Zhou M, Zhang Y, Shen F, Cao J et al. Value of bevacizumab in treatment of colorectal cancer: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2015. 28;21(16):5072-80.
  59. Qi-Bin Song, Qi Wang, Wei-Guo Hu. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2015. 14;21(14): 4365–72.
  60. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol.* 2015. 26(1):13-21.
  61. Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, Cutsem EV. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol.* 2012;30(29):3570-77.
  62. Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(7):692-700.
  63. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M et al. Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2013;369(11):1023-34.
  64. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, Braud F et al. Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With and Without Cetuximab in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):663-71.
  65. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M et al. Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol.* 2010;28(31):4697-705.
  66. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol.* 2012;30(28): 3499–3506.
  67. Li J, Qin S, Xu R, Yau TC, Ma B, Pan H et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):619-29.
  68. Abstract number 0-0022. 16th ESMO World Congress on Gastrointestinal Cancer. Phase III Trial Shows Improved Survival With TAS-102 in Metastatic Colorectal Cancer Refractory to Standard Therapies. *Ann Oncol.* 2014;25(2).

69. Yoshino T, Mizunuma N, Yamazaki K, Nishina T, Komatsu Y, Baba H et al. TAS-102 monotherapy for pretreated metastatic colorectal cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(10):993-1001.



# Carl Remigius Fresenius: Analytical Chemistry's Father

**Title in Spanish:** *Carl Remigius Fresenius: Padre de la Química Analítica*

Julia Martín<sup>1</sup>, Carlota Elisa Muriel Neira<sup>1</sup>, Agustín G. Asuero<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Analítica, Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla.

**ABSTRACT:** This paper reviews aspects of the life and work of Carl Remigius Fresenius, an eminent German chemist of the nineteenth century considered as the father of analytical chemistry. The manuscript is divided into several sections and emphasizes the publication of two textbooks on qualitative (1841) and quantitative (1845) analysis, which became a landmark for nearly a century, paying also attention to the systematic cation analysis known as "hydrogen sulphide scheme", to the foundation of a laboratory in Wiesbaden (1848) for the teaching of chemistry and its practical applications, and in the founding of the first analytical journal, "Zeitschrift für analytische Chemie" (1862). Fresenius is considered by the Federation of European Chemical Societies as one of the hundred most distinguished chemists of the history.

**RESUMEN:** En este trabajo se pasa revista a los aspectos de la vida y de la obra de Carl Remigius Fresenius, un eminente químico alemán del siglo XIX considerado como el padre de la Química Analítica. El trabajo se divide en varias secciones y hace hincapié: i) en la publicación de sus dos libros de texto sobre análisis cualitativo (1841) y cuantitativo (1845), que se convirtieron en un referente durante casi un siglo, en la sistemática de cationes conocida como marcha del sulfhídrico; ii) en la fundación de un laboratorio en Wiesbaden (1848) destinado a la enseñanza de la química y a sus aplicaciones prácticas, y; iii) en la fundación de la primera revista analítica, el "Zeitschrift für analytischen Chemie" (1861). Fresenius es considerado por la Federación Europea de Sociedades Químicas como uno de los cien químicos más eminentes de la historia.

\*Corresponding Author: asuero@us.es

Received: May 5, 2017 Accepted: May 7, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 2 (2017), pp. 200-210

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo tiene por objeto adentrarse en la vida y obra de Carl Remigius Fresenius, un científico alemán que puede considerarse como padre de la química analítica. La obra de Fresenius ha ejercido una enorme influencia en la formación de farmacéuticos y químicos durante décadas. Creador de una dinastía científica que se ha mantenido viva a lo largo del siglo XX, Fresenius es considerado como uno de los químicos más eminentes de la historia. Pasamos revista de forma secuencial a aspectos de su vida y obras, al laboratorio que crea en Wiesbaden, todo un referente, a la marcha del sulfhídrico como se la conoce, a sus libros de texto de análisis cualitativo y cuantitativo, y a la primera revista científica analítica, el "Zeitschrift für analytische Chemie" por él fundada, concluyendo con algunas consideraciones finales.

## 2. ASPECTOS DE LA VIDA Y OBRA DE CARL REMIGIUS FRESENIUS

Carl Remigius Fresenius nace en Frankfurt el 28 de Diciembre de 1818, y fallece en Wiesbaden el 11 de Junio de 1897 (1-5). Hijo menor del abogado Dr. Juris Jacob Heinrich Samuel Fresenius y Marie Veronika Finger, se le considera uno de los grandes referentes en el campo de la química analítica (6-8). Fresenius es uno de los hombres

eminentes de su generación que conectan con el periodo de Liebig, caracterizándose tanto por su brillantez como por su actividad en variados campos del saber (3).

Hasta la Guerra de los Treinta años la mayoría de sus antepasados masculinos habían sido ministros protestantes (2). Fresenius inicia su formación científica en su Ciudad natal, ejerciendo de aprendiz en una farmacia durante cuatro años (3, 9, 10), actividad que simultánea con la asistencia a conferencias sobre química, física y botánica. En esos años de juventud, practicaba también la química en un pequeño laboratorio instalado en el jardín de la casa de su abuelo (6, 10).

En 1840 se matricula en la Universidad de Bonn, donde permanece bajo la tutela de distinguidos profesores como Bischof, Treviranus, Vogel, Noggerath y Marquart, y estudia ciencia, historia y filosofía (2, 3). Allí, en el transcurso de su segundo semestre, con la ayuda y apoyo de Marquardt en cuyo laboratorio trabaja, escribe su primer libro "Anleitung zur qualitativen chemischen Analyse" (1, 5, 9-11), basado casi totalmente en sus propias experiencias. En aquellos tiempos muy pocas instituciones daban la oportunidad de experimentación práctica, y Bonn no era uno de ellos.

Ludwig Clamor Marquart, farmacéutico alemán, es el



introdutor del término antocianina (12, 13), derivado del griego anthos (flor) y kyanos (azul) para designar a los pigmentos azules de las plantas. El nombre se aplica hoy día a los pigmentos del grupo con independencia de su color (rojo, azul, púrpura, malva, magenta).

Fresenius dedica la primera edición del libro a Marquart. En la segunda edición (Figura 1) y sucesivas

aparece un prefacio de Liebig. La obra llega a tener dieciséis ediciones en alemán, y es traducida al inglés (ocho veces) (14), francés (15), italiano, ruso, español (16, 17), holandés, húngaro y chino. La edición decimoséptima, revisada por su hijo, es traducida en 1921 por C.A. Mitchell como "Introduction to Qualitative Chemical Analysis" (9).



Figura 1. Segunda edición alemana de la obra de Carl Remigius Fresenius *Análisis Químico Cualitativo* (11).

El objetivo principal de sus experimentos es la identificación cualitativa de los distintos elementos por el método de vía húmeda (2, 4). Fresenius se enfrenta a la falta de directrices existentes para la práctica del análisis cualitativo sistemático. Los textos previos consideraban sólo el comportamiento de los elementos en presencia de diversos reactivos, pero no sugerían métodos sistemáticos (7) para la identificación de los componentes de una mezcla de sustancias desconocidas. Fresenius idea un método propio para la identificación sistemática (18) y la separación de los metales individuales (cationes) y los no metales (aniones), a la vez que selecciona de entre la gran multitud de reacciones posibles, las que considera más adecuadas (2).

En 1841 se traslada a Giessen, como Marquart le había aconsejado, para continuar sus estudios bajo la dirección de Justus von Liebig (3, 9), asistiendo también allí a las clases impartidas por Heinrich Buff y Hermann Kopp (2). Liebig es un gran educador y ejerce una influencia profunda sobre Fresenius (10). Su sistema de análisis cualitativo sistemático de elementos inorgánicos funciona tan bien que en 1842 presenta la segunda edición de su libro como Tesis Doctoral, defendida el 23 de julio de 1842 (10). La tercera edición fue publicada en 1844, la cuarta en 1846, y la quinta en 1847.

Dedica su segundo libro (19), "Anleitung zur quantitativen Chemischen Analyse" publicado en 1845, al análisis cuantitativo, y es traducido al inglés y holandés (2) y otros idiomas (20). El 23 de junio de 1843 recibe la habilitación como docente privado en Giessen, donde permanece hasta septiembre de 1845, cuando se le ofrece una plaza de Profesor de Química, Física y Tecnología en el Instituto Agrícola en Wiesbaden (1, 6, 10, 21-23).

Justo antes de trasladarse a Giessen, se casa con su prima Charlotte Rumpf, con la que tiene cuatro hijas y tres hijos. Dos de ellos, Heinrich y Wilhelm, y el nieto de unas de sus hijas se dedican también al estudio de la química (2), prosiguiendo la obra que él había comenzado (24). Tras años de matrimonio fallece su esposa, y se casa en segundas nupcias con Auguste Fritze, amiga de su primera esposa.

### 3. EL LABORATORIO DE WIESBADEN

En 1845 comienza su labor docente en el Instituto Agrícola, a la vez que imparte conferencias nocturnas de química experimental en el Palacio Ducal, durante el invierno de 1845-1846 (3, 6, 7). El Colegio estaba muy mal equipado, no existiendo laboratorio alguno, ya destinado al propio trabajo experimental o al educativo, situación que no encajaba con su punto de vista (10).

Decide por esta circunstancia fundar su propia Escuela de Química, con un subsidio financiero que le otorga el Estado, al haber sido reconocida oficialmente su enseñanza por el Gobierno del Ducado de Nassau (5).

En 1847 compra una casa, en la que habilita también un laboratorio, inaugurado el 1 de mayo de 1848. Se ofrecía a los alumnos formación en química práctica, especialmente en los procedimientos analíticos (2, 22, 25). Al principio el laboratorio contaba con cinco estudiantes que trabajaban bajo la dirección de Emil Erlenmeyer, más tarde profesor de Química en la Universidad de Múnich (9). El número de alumnos aumenta rápidamente, y en el curso 1854-1855 ya eran treinta y ocho, junto con tres profesores (2, 3, 25).

Existían en aquel entonces en Alemania muy pocos laboratorios de formación química, y una buena parte de la industria química y farmacéutica, que estaba “*in crescendo*”, mantenía muy buenas relaciones con el laboratorio de Fresenius (2), como por ejemplo los casos

de A. Brüning, E. Lucius, W. Kalle, L. Merck, R. Koepp, y D. Haën, antiguos alumnos en Wiesbaden. El programa de formación del laboratorio se va ampliando, completándose y mejorándose en sucesivas etapas (2, 3, 6).

En 1862 se crea una sección farmacéutica incluyéndose un programa de preparación para los estudiantes de Farmacia, destinado a la superación del examen farmacéutico estatal, que tuvo mucho éxito. El Ducado de Nassau concedía créditos universitarios para estudiar en el laboratorio de Fresenius, pero esta situación se interrumpe cuando Nassau fue tomada por Prusia (9). Una década después el laboratorio (Figura 2) comienza a ofertar formación en Química y Nutrición, fundándose finalmente un departamento de Higiene y Bacteriología en 1884 con el Dr. Hueppe al frente como primer director (3), que facilita la formación de personal en salud pública, y cada vez en mayor medida la formación de técnicos de laboratorio (2).



Figura 2. Laboratorio de Química de Wiesbaden, con Fresenius al frente (21).

Una parte de dicho laboratorio se orientó hacia la aplicación de muchos de los métodos desarrollados en respuesta (21, 23) a los problemas existentes en la época. En 1849, Fresenius comienza a analizar de modo sistemático las aguas minerales de una gran parte de los manantiales de la región de Nassau y de otros manantiales de Alemania y de países extranjeros (6, 21). Este tipo de ensayos se extendió pronto a los productos naturales y fabricados, con el propósito práctico de la determinación exacta de sus componentes químicos (23). Estos valores se utilizaron tanto con fines comerciales como para la

resolución de conflictos entre empresas y clientes. Todo esto se tradujo en el desarrollo de mejores métodos y procedimientos analíticos (3).

También fue creado en el establecimiento un laboratorio de agricultura, lo que condujo finalmente al desarrollo de la Química Agrícola y a la creación de un departamento de cata de vinos en 1868 (2, 5). La importancia del Departamento de Bacteriología e Higiene sigue creciendo, bajo la posterior dirección de G. Frank, realizando pruebas de higiene y bacteriología para la industria de los productos alimenticios, especialmente de

aguas y bebidas.

El laboratorio sigue creciendo, y los hijos de R. Fresenius, Heinrich y Wilhelm, y su nieto, continúan la tradición (3, 21). En el verano de 1897 el laboratorio emplea a 16 estudiantes, un número similar de auxiliares, y 54 aprendices (9). Estando Fresenius pensando en la jubilación, tras su centésimo semestre en el laboratorio, fallece de repente tras sufrir un infarto, la noche del 10 al

11 de junio de 1897 (2, 10, 22, 25). Sus restos reposan en el antiguo cementerio de Wiesbaden (Figura 3) (26). El árbol genealógico de los Fresenius (27), se muestra en la Figura 4. Wilhelm (II) Friedrich Nills Remigius Fresenius fallece en 2004, a la edad de 91 años, a la que continuaba trabajando con éxito en el Instituto fundado por su bisabuelo, Carl Remigius Fresenius (24).



Figura 3. Tumba de Carl Remigius Fresenius en el cementerio antiguo de Wiesbaden (26).

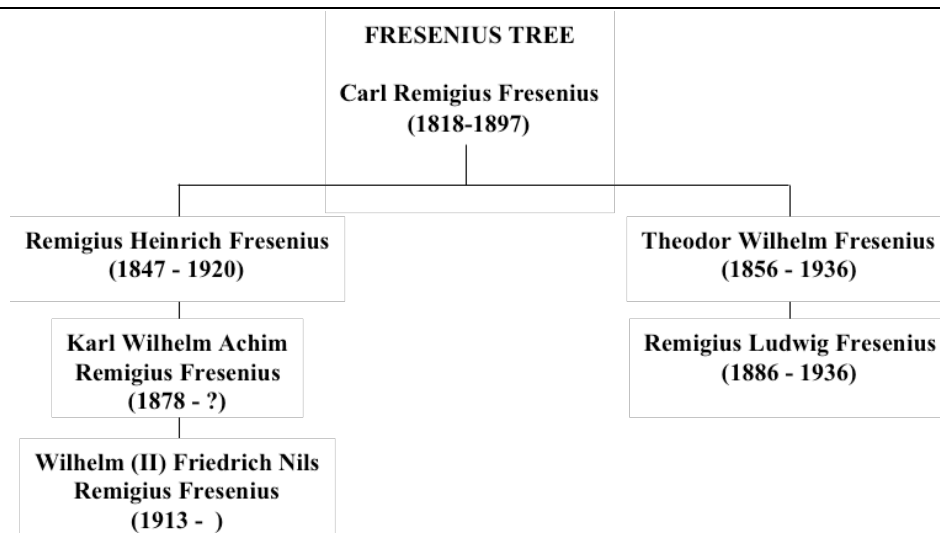


Figura 4. Árbol genealógico de los Fresenius (27).



#### 4. LA MARCHA DEL SULFHIDRICO

Entre los logros significativos de Fresenius, podemos citar la marcha sistemática para la separación de sustancias que se presenta en su primer libro (3, 18, 28). Particularmente importante es la presentación, ya en la

primera edición, de la separación sistemática de iones en el grupo de precipitados del sulfuro de hidrógeno. La presentación es mucho más clara y concisa que la del libro de Heinrich Rose (Figura 5), en el que Fresenius claramente se basa.

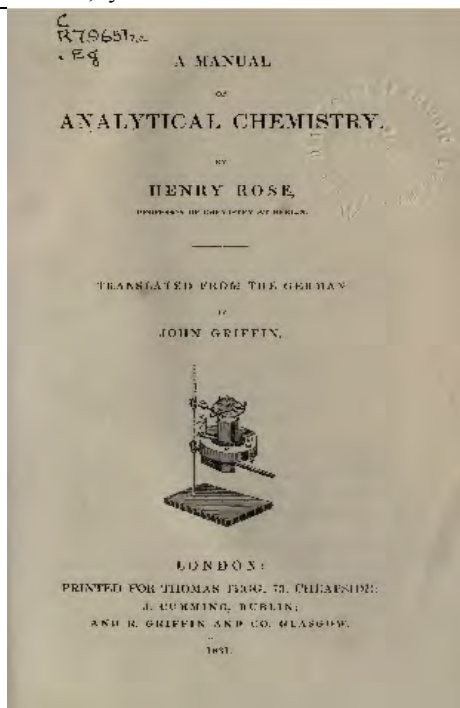


Figura 5. Portada de la traducción inglesa del tratado de Química Analítica de Heinrich Rose.

El sistema de separación se modifica y amplia en la tercera edición, publicada en 1844, pero es sorprendente el hecho de que la sistemática para la separación de iones metálicos con el uso de ácido sulfhídrico e hidróxidos se ha mantenido y se utiliza prácticamente sin cambios en esta forma original, incluso hoy en día (3, 29-31). La recomendación original para la separación del grupo de

sulfuro de amonio ha sido testigo, en cambio, de muchas modificaciones y adiciones a lo largo del tiempo (3).

A la izquierda (Figura 6), se muestra el diagrama de Rose para la separación del grupo del sulfuro de hidrógeno; a la derecha se muestra la misma separación, bajo el diagrama de R. Fresenius (3, 9, 32).

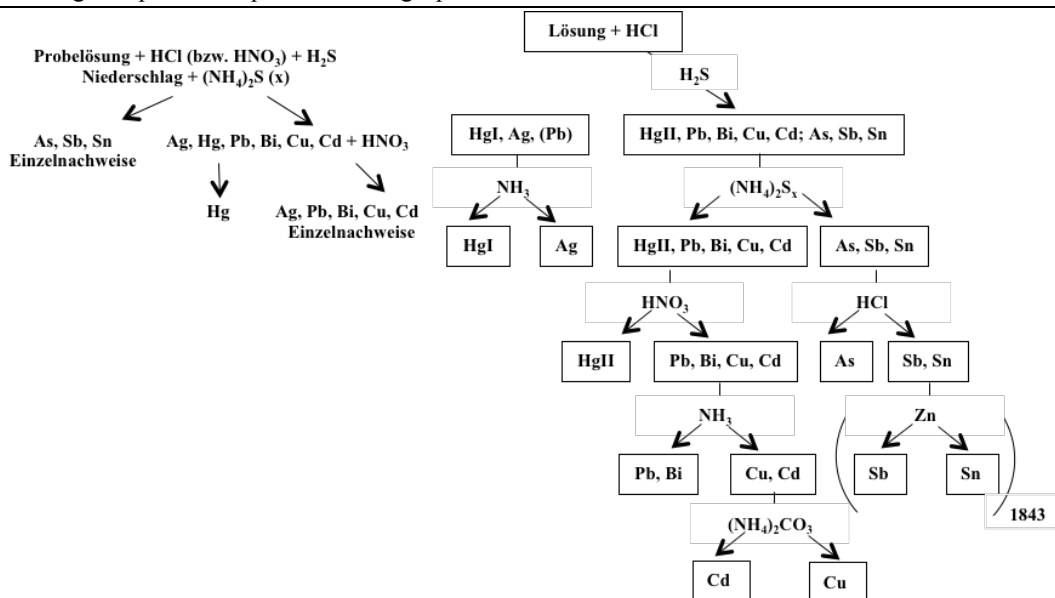


Figura 6. Diagramas de Rose (izquierda) y de Fresenius (derecha) para la separación de sulfuros (3).

Fresenius divide los cationes (u óxidos metálicos, como se les llamaba entonces bajo la teoría dualista de Berzelius) en seis grupos. En el mismo grupo estaban clasificados los cationes que se comportan de la misma manera (precipitan o, con menor frecuencia, se disuelven) en presencia de un reactivo dado bajo condiciones experimentales específicas. El reactivo básico usado es el sulfuro de hidrógeno; determinándose las propiedades y el comportamiento de los diversos sulfuros metálicos en diferentes situaciones (2). Se sigue la clasificación :

Grupo 6: metales que forman un precipitado con sulfuro de hidrógeno en disolución alcalina o ácida: mercurio (+1, +2), plomo, bismuto, plata, cobre y cadmio. La plata, el mercurio (+1), y el plomo precipitan en medio ácido clorhídrico.

Grupo 5: oro, platino, antimonio, estaño (+4, +2), arsénico (+3, +5), cuyos sulfuros son solubles en sulfuro de amonio.

Grupo 4: metales cuyos sulfuros son precipitables solamente en disolución alcalina o neutra: zinc, manganeso, níquel, cobalto, y hierro (+3, +2).

Grupo 3: metales cuyos sulfuros son solubles y cuyos hidróxidos son precipitables con sulfuro de amonio: aluminio y cromo.

Grupo 2: metales cuyos sulfuros son solubles y se precipitan con carbonatos alcalinos y fosfatos alcalinos: bario, estroncio, calcio y magnesio.

Grupo 1: tanto los sulfuros y carbonatos son solubles: sodio, potasio, y amonio.

Esta clasificación coincide exactamente con la que todavía está en uso hoy en día, a excepción de los grupos 4 y 3 que fueron posteriormente fusionados y la numeración se invirtió, el grupo 6 de Fresenius se convirtió en la clase 1, etc. Fresenius no se contenta con la separación de grupos, y a través del tratamiento con otros reactivos adecuados, separa cada grupo en sus elementos individuales (3, 9). Las primeras ediciones del texto carecían de estas separaciones sistemáticas representadas como Tablas en la Figura 6, por razones aclaradas en el prefacio de la 4ª edición, publicada en 1846. El número de reactivos que emplea es relativamente pequeño, lo que hizo que su sistema fuese simple y fácil de aprender.

Otros de los grandes logros de su trabajo (2) es el empleo de cianuro de potasio en el trabajo analítico, la diferenciación de los espejos de arsénico y antimonio en el ensayo de Marsh, el método de cianuro para detectar arsénico en casos forenses (con Babo), o sus numerosas contribuciones al análisis de fosfatos, acetato y sulfatos.

## 5. LOS LIBROS DE TEXTO: COMENTARIOS ADICIONALES

Para Fresenius, la Química Analítica es una rama particular de la Química que se ocupa especialmente de la descomposición (del análisis) de los cuerpos intentando descubrir en ellos los elementos simples. El análisis se llama cualitativo si únicamente deseamos un conocimiento de estos elementos en lo que se refiere a su naturaleza, pero si se pretende encontrar la cantidad de cada elemento, las proporciones ponderales según las cuales entran en la composición del compuesto, entonces se llama cuantitativo (32). Las portadas de las ediciones de 1877 y 1887 de la obra *Análisis Químico Cuantitativo* de Fresenius se muestran en la Figura 7.

Gran parte de su trabajo estuvo relacionado con la publicación de sus libros. Se planteó como objetivo ensayar todos los métodos de análisis, que incluyó en sus libros, con el deseo de suministrar la información más exacta posible y con la máxima precisión (7). Su principal interés radicó en los métodos de análisis (18), y se opuso, de forma activa en un primer momento, y de forma pasiva en los últimos años, a todo lo que le llevaba a interponerse en el camino de la química analítica.

Los tratados de *Análisis Químico Cualitativo* y *Análisis Químico Cuantitativo* de Fresenius permanecen en una posición prominente en Alemania como textos de referencia durante al menos tres cuartos de siglo, siendo durante este periodo revisado y reimpresso frecuentemente (33).

Sus obras son traducidas como se ha comentado a muchos idiomas. En concreto Magín Bonet y Bonfill traduce la obra de Fresenius sobre *Análisis Químico Cualitativo* cinco años después de la primera edición alemana, en 1846, Ramón Ruiz en 1953, y Vicente Peset y Cervera más tarde.

En la bibliografía se recogen las primeras ediciones de sus obras sobre análisis químico cualitativo y cuantitativo, en alemán, inglés, francés y español. La duplicación de muchos de los antiguos equivalentes, que resultaba necesaria tras la aceptación de las leyes de Avogadro y de Dulong y Petit, fue un duro golpe para Fresenius, y asistió por tanto a la decadencia, o mejor dicho, a la derrota de las concepciones dualistas (2) con consternación y tristeza, destacándose siempre en sus escritos por el uso de la notación "equivalentista" antigua (6).

Cada vez resultaba más obvio que la forma de los libros de texto requería un cambio, ya que el número de estudiantes que aprendían con un mismo profesor iba en aumento. El trabajo para preparar estas ediciones sobre análisis químico cualitativo y cuantitativo limitó el tiempo de dedicación a ediciones de otras obras suyas sobre Agricultura y química agrícola (3).



Figura 7. Análisis Químico Cuantitativo de Fresenius, 1877 y 1887 (21).

## 6. EL “ZEITSCHRIFT FÜR ANALYTISCHEN CHEMIE”: PRIMERA REVISTA ANALÍTICA

El mérito principal de Fresenius reside tanto en la publicación de sus dos obras de Química Analítica, traducidas a una multitud de idiomas y consideradas las guías más valiosas escritas para el análisis inorgánico; como en la creación y desarrollo de la revista “Zeitschrift für Analytische Chemie” (Figura 8). Al no existir todavía una revista específica en la que reunir todos los nuevos métodos analíticos y los beneficios que suponen para los conocimientos químicos, el “Fresenius Zeitschrift für Chemie Analytische”, vino a cubrir una laguna existente en el ámbito de la bibliografía científica (9).

La iniciativa que conduce a la formación de una nueva revista “Fresenius Zeitschrift für Chemie Analytische”, es llevada a cabo por Fresenius durante 1861 (1, 3, 10). En otros países, se sigue pronto el ejemplo de Fresenius, y “The Analyst”, la revista analítica de “The Society for Analytical Chemistry”, que inicia su aparición en Londres en 1875, es la segunda revista especializada en Química Analítica.

La revista se crea para mejorar la eficiencia del desarrollo químico debido a la relación causa- efecto que existe entre los métodos analíticos nuevos o mejorados y los grandes avances de la química (2). Anunciando el primer número de la revista Fresenius señalaba: “puede demostrarse sin dificultad, que cualquier proceso

importante en Química está más o menos directamente relacionado con métodos de análisis nuevos o mejorados”.

Entre los numerosos ejemplos de esta relación pueden citarse: el análisis de sales provocado por el reconocimiento de las leyes estequiométricas (los avances en el análisis inorgánico hicieron cada vez más exactas las equivalencias); avances en la química orgánica y en la síntesis (debido a la aplicación de métodos exactos de análisis orgánico); y el análisis espectral que condujo al descubrimiento de nuevos metales.

Fresenius incluye en la revista en primer lugar los trabajos que cubren todas las facetas de la química analítica; y en segundo lugar, informes en curso, admitiendo cuando era necesario los comentarios y críticas (3, 34). El primer número se publica en diciembre de 1861, hace más de 150 años, e incluía contribuciones de autores bien conocidos como Kirchhoff, Bunsen y Schöbeinen sobre los espectros de los metales alcalinos y alcalinotérreos y sobre un espectrómetro compacto para el uso de laboratorio (2, 34). Los informes sobre métodos analíticos generales, operaciones analíticas, aparatos y reactivos, así como el análisis de las sustancias inorgánicas eran escritos inicialmente por el propio editor, y los análisis orgánicos e informes sobre métodos analíticos especiales por su colaborador más cercano, C. Naubauer. El número de fascículos al año crece progresivamente.

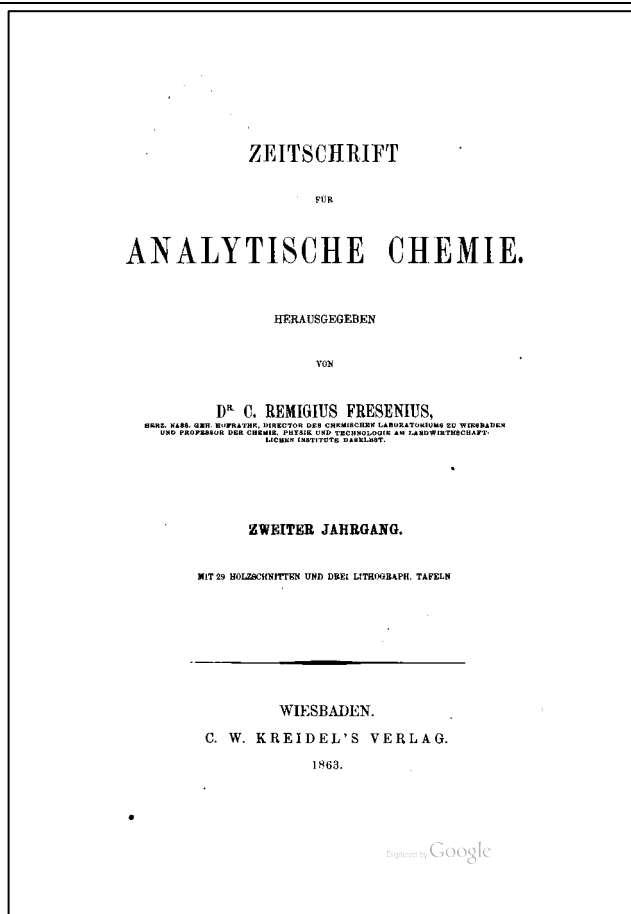


Figura 8. Número 2 de “Zeitschrift für analytischen Chemie” (25).

Fresenius crea la tradición de proporcionar a los lectores informes críticos de la bibliografía científica, continuando la revista con esta tradición durante 130 años, y convirtiéndose en un sello distintivo de la misma. La publicación de resúmenes críticos continúa hasta 1994, adoptándose a partir de este momento la decisión de incluir trabajos de autores por invitación (34).

La revista, inicialmente, se publica sólo en alemán; las primeras contribuciones en inglés aparecen en la década de 1950. Durante muchos años, los artículos de investigación en alemán e inglés van alternándose, hasta adoptar el inglés en 1990 como idioma único para la publicación de los trabajos originales. Con la aparición del Vol. 336, la revista se publica bajo el título de “Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry” reemplazando al título alemán de “Fresenius’ Zeitschrift für analytische Chemie”. El título fundacional había sido “Zeitschrift für Chemie Analytische”.

La revista ha estado estrechamente relacionada con el Laboratorio y la familia de Fresenius (35). Durante sus primeros 140 años de historia, el “Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry” es editado por miembros de la familia Fresenius (34), un caso único en la historia de la ciencia. Tras su fundación en 1861, Carl Remigius Fresenius edita la revista hasta el vol. 20 (1881).

Los volúmenes del 21 al 36 (1897) se editan

conjuntamente por Carl Remigius Fresenius y su hijo Heinrich Fresenius, y los volúmenes del 37 al 58 por Heinrich Fresenius, Wilhelm Th. Fresenius y Ludwig Fresenius; el vol. 105 (1936) por Remigius Fresenius y Ludwig, y los vols. 106-127 (1944) por Remigius Fresenius. El vol. 128 (1948) fue editado por Albin Kurtenacker (36).

Los vols. 129 (1949) al 187 (1962) son editados conjuntamente por Wilhelm Fresenius y Albin Kurtenacker; los vols. 188 (1962) al 310 (1982) por Wilhelm Fresenius, y desde el vol. 311 (1982) hasta el año 2001 por Wilhelm Fresenius e Ingo Lüderwals.

A partir de 2002, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, Analisis y Química Analítica se fusionan convirtiéndose en el “Analytical and Bioanalytical Chemistry”, sexto miembro de una familia de revistas europeas (32). Un desafío al que la revista de Química Analítica de Fresenius se ha enfrentado siempre es el reto al cambio. El campo de la química analítica ha sufrido muchos cambios, por lo que el contenido de la revista ha cambiado en el transcurso de los años. Los primeros números se centraban en el análisis de muestras inorgánicas, mientras que hoy en día el análisis de muestras orgánicas y biológicas tiene mayor relevancia (34).

## 7. CONSIDERACIONES FINALES

La determinación de la composición de una sustancia problema exige un enfoque sistemático basado en una clasificación (18). El sistema de grupos que formaba la base del método de análisis cualitativo iniciado en el siglo XIX (aún en uso hoy día) aparece por primera vez (8, 9) en los trabajos de Heinrich Rose (1795-1864), pero comienza a tomar forma con Bergman y alcanza claridad y concisión

con Fresenius (6, 7), como hemos tenido oportunidad de exponer previamente.

Fresenius (Figura 9) es considerado, junto con Bunsen, el representante por excelencia de la Química Analítica del siglo XIX, y el más preeminente en encontrar aplicaciones prácticas para los métodos químicos (37). El “Nestor” de los químicos analíticos, como reconoce *The Analyst* en su obituario (5).



KARL REMIGIUS FRESENIUS (1818-1897)

**Figura 9. Karl Remigius Fresenius (37).**

A los 29 años funda en Wiesbaden (Alemania) el primer laboratorio químico destinado a la enseñanzas del Análisis. Fue autor de libros de textos de renombre mundial, fundador de una escuela y considerado como un buen maestro y referente de una larga línea de químicos eminentes (2, 21, 38, 39), honrado por sus compañeros de profesión, y un hombre de gustos y hábitos sencillos (10, 22, 25).

Sacaba tiempo para estar con su familia y disfrutar de sus nietos. Era un gran amante de la poesía (10). Le gustaba pasear por espacios abiertos para relajarse, convirtiéndose esta forma de ejercicio en una necesidad diaria. Cuando las condiciones externas no eran adecuadas, paseaba por las galerías, en cuyas paredes fue depositando versos sencillos para su lectura y disfrute, aunque al ser traducidos puedan perder parte de su encanto (10).

Cabe destacar que el día en que murió, el “New York Times” publicó un obituario en su honor, algo que indica la importancia que alcanzó en su época. (40). También la prestigiosa Revista “Nature” (41), y otras como “The Analyst” (5), además de las propias revistas alemanas. La misma consideración se ha tenido con los miembros de su

familia, dedicados al cultivo de la Química (24).

El trabajo de Fresenius le hizo merecedor del reconocimiento público, y de muchos honores (2, 3, 5). Fue uno de los socios fundadores de la asociación de industrias químicas (2). Fue varias veces presidente de la “Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte” y miembro honorario de la “Gesellschaft Deutscher Chemiker”. Sus coetáneos lo describen como un hombre profundamente religioso, con un excelente sentido del humor, y un padre ejemplar.

La Federación Europea de Sociedad Químicas considera a Carl Remigius Fresenius como uno de los cien químicos europeos más distinguidos a lo largo de la historia (42). En 1961, la “Gesellschaft Deutscher Chemiker” estableció un premio Fresenius para destacar los logros sobresalientes en el campo de la Química Analítica (2).

Phi Lambda Upsilon (43), es una Sociedad Química fundada en Illinois en 1899 para promocionar la investigación original y dotar becas. Phi por Fresenius, considerado padre de la Química Analítica; Lambda por Liebig; y Upsilon por Van’t Hoff, padre de la Química

Física Teórica. PLC otorga un Premio Fresenius, de reconocido prestigio. Químicos tan eminentes como Roald Hofmann, Premio Nobel en 1981, y Martin Karplus, Premio Nobel en 2013, recibieron el PLC Fresenius Award en 1969, y 1965, respectivamente (44).

## 8. REFERENCIAS

1. De Castro FA. La Química Analítica en el mundo. *Balnea* 2012; 5: 177-195.
2. Szabadvary F. Fresenius, Carl Remigius. En *Complete Dictionary of Scientific Biography*, Vol. 5. Detroit: Charles Scribner's Sons 2008; pp. 163-165.
3. Moore DS, Fresenius WC. Remigius Fresenius, 1818-1897, founder of Institut Fresenius and "Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie" now Fresenius' Journal of Analytical Chemistry Born 28 December 1818/ Died 11 June 1897. *Fresenius J Anal Chem* 1997; 358: 453-455.
4. Anonymous. Remigius Fresenius. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1919; 52 2: A33-A40.
5. Obituary OH. Dr. C. Remigius Fresenius. *Analyst* 1897; 22: 169-171.
6. Poth S. Carl Remigius Fresenius 1818-1897. *Wegbereiter der analytischen Chemie*. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag 2007.
7. Schwedt C. Carl Remigius Fresenius und Seine analytischen Lehrbücher – ein Beitrag zur Lehrbuchcharakteristik in der analytischen Chemie. *Fresenius Z Anal Chem* 1983; 315 5: 395-401.
8. Laitinen AA, Ewing GW. *A History of Analytical Chemistry*. York, Pa.: ACS, The Mapple Press Company 1977; pp. 14-15, 55.
9. Szabadvary F. *History of Analytical Chemistry*. Y-Park: Gordon and Breach 1992; pp. 166-171.
10. Oesper RE. The epigrams of Remigius Fresenius I. *J Chem Educ* 1937; 14 7: 313- 315.
11. Fresenius R. *Anleitung zur qualitativen chemischen Analyse oder systematisches Verfahren zur Auffindung der in der Pharmazie, den Künsten und Gewerben häufiger vorkommenden Körper*. Bonn: Verlag von Henry & Cohen 1841.
12. Bueno JM, Sáez-Plaza P, Ramos-Escudero F, Jiménez AM, Fett R, Asuero AG. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. *Crit Rev Anal Chem* 2012; 42 2: 126-151.
13. Lee DW, Gould KS. Why Leaves Turn Red. *Am Sci* 2002; 90: 524-531.
14. Fresenius CR. *A System of Instruction in Qualitative Chemical Analysis*. 5th ed., Editado por J. Lloyd Bullock FCS. London: John Churchill 1849.
15. Fresenius CR. *Précis D'Analyse Chimique Qualitative ou Traité des opérations chimiques, des réactifs et de leur action sur le corps les plus répandus suivi d'un procédé systématique d'analyse appliquée au corps le plus fréquemment employés en pharmacie et dans les arts*, Edición francesa realizada sobre la tercera edición alemana por el Dr. SACC hijo. Paris: Fortin, Masson et Cie 1845.
16. Fresenius CR. *Analisis Quimica Cualitativa o Tratado de las operaciones químicas, de los reactivos y su acción sobre los cuerpos más generalmente esparcidos, seguido de un procedimiento sistemático de análisis aplicado a los cuerpos que mas se usan en Farmacia y en las Artes*, traducido de la segunda edición francesa por D. Ramon Ruiz. Madrid: Imprenta a cargo de Manual A. Gil 1853.
17. Fresenius R. *Compendio de Analisis Quimica Cualitativa, o Tratado de las operaciones químicas, de los reactivos y de su modo de obrar con los cuerpos más esparcidos, acompañado de un procedimiento sistemático de análisis aplicada a los cuerpos más generalmente empleado en Medicina, Farmacia y en las Artes*, traducido por el Dr. D. Magin Bonet y Bonfill. Barcelona: Imprenta de Pedro Fullá 1846.
18. Pérez-Bustamante JA. Karl Remigius Fresenius 1818-1897: Rationalisation and systematization of Chemicals analysis. *Química Analítica* 1997; 16: 139-141.
19. Fresenius CR. *Anleitung zur Quantitativen Chemischen Analyse oder die Lehre von der Gewichtsbestimmung und Scheidung der in der Pharmacie, den Künsten, Gewerben und der Landwirtschaft häufiger vorkommenden Körper in einfachen und zusammengesetzten Verbindungen*. Braunschweig: Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn 1845.
20. Fresenius CR. *Précis d'Analyse Chimique Quantitative ou Traité du dosage et de la séparation des corps simples et composés les plus usités en pharmacie, Dans les arts et en agriculture*. Paris: Victor Masson: Paris 1847.
21. Gros L. *Historische Stätten der Chemie Carl Remigius Fresenius und das chemische Laboratorium Fresenius Wiesbaden*. Frankfurt am Main: Gesellschaft Deutscher Chemiker 2013.
22. Fresenius W. Remigius Fresenius. *Fresenius Z Anal Chem* 1962; 192 1: 3-14.
23. Fresenius R. 100 Jahre Chemisches Laboratorium Fresenius zu Wiesbaden 1848-1948. *Fresenius Z Anal Chem* 1948; 28 4-5: 363-373.
24. Roman S. Un genio de la química por tradición familiar. *El Mundo*, Año XV, Núm. 5356, Domingo 8 de Agosto de 2004.
25. Fresenius H. Zur Erinnerung an R. Fresenius. *Zeitschrift für Analytische Chemie* 1897; 36: III-XVIII.
26. Tumba de Carl Remigius Fresenius en el cementerio antiguo de Wiesbaden. <https://www.kudaba.de/?p=33995#16/50.0911/8.2301>
27. Andraos J. *Genealogy Trees, By Families, Fresenius, Fresenius Tree*; <http://careerchem.com/NAMED/TREES->

PEOPLE/Fresenius-famili.pdf

28. Pérez-Bustamante JA. A schematic overview of the historical evolution of analytical chemistry. *Fresenius J Anal Chem* 1997, 357 2; 151-161.
29. Petrucci RH, Harwood WS, Herring FG, Madura JD. *General Chemistry: Principles and Modern Applications*. 9th ed., Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall 2007; pp. 18-9; *Qualitative Cation Analysis*, pp. 765-771.
30. Valcárcel M. *Principles of Analytical Chemistry: a Textbook*. Berlin: Springer 2000.
31. Meites L. *Handbook of Analytical Chemistry*. New York: McGraw-Hill 1963; pp. 2-3.
32. Asuero AG. *Química y Medida: de los orígenes a la miniaturización una perspectiva histórica de la Química Analítica*, monografía, comunicación privada.
33. Anonymous. 1 Introduction to Qualitative Chemical Analysis 2 A Text-book of Practical Chemistry 3 Public Health Chemical Analysis. *Nature* 1921; 107: 708-710.
34. Fresenius W. One hundred and forty years “Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry”. *Fresenius J Anal Chem* 2001; 371 8: 1041-1042.
35. Murphy WJ. Fresenius celebration. *Anal Chem* 1948; 20 3: 187-187.
36. Oesper RE. Albin Kurtenacker, *J Chem Educ* 1952; 29 10: 487-487.
37. Anonymous, Karl Remigius Fresenius. *J Chem Educ* 1937; 14 3: 10.
38. Giennann RA, Beckmann EO. En *Complete Dictionary of Scientific Biography*. Vol 1, Detroit: Charles Scribner’s Sons 2008; pp. 553-554.
39. Kauffman GB. Genth, Frederick Augustus. En *Complete Dictionary of Scientific Biography*. Vol. 5. Detroit: Charles Scribner’s Sons 1972; pp. 349-350.
40. Anonymous. Death of Prof. K.R. Fresenius. *The New York Times*, published July 3 1897.
41. Anonymous. Professor R. Fresenius. *Nature* 1897; 56: 202-202.
42. FECS, Federation European of Chemical Societies Millennium Project 100 Distinguished European Chemists, 19th Century, Fresenius, Carl Remigius. Born: Frankfurt-am-Main Germany, 1818. Died: Wiesbaden Germany, 1897. <http://www.chemsoc.org/networks/enc/FECS/Fresenius.htm>.
43. PLU, Phi Lambda Upsilon, The National Chemistry Honor Society, Founded March 1899, 2014; <http://philambdaupsilon.org>.
44. PLU, Phi Lambda Upsilon, The National Fresenius Award, 2014; <http://philambdaupsilon.org/national-fresenius-award/>







# Latency-reversing agents as part of the strategies to cure HIV infection

**Title in Spanish:** *Agentes reversores de latencia como parte de las estrategias para curar la infección HIV*

M.<sup>a</sup> del Carmen Avendaño López<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Catedrática de Química Orgánica y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

**ABSTRACT:** There is no cure yet for HIV-1, but therapeutic research based on the elimination of the latent viral reservoir by pharmacologic strategies is going on. We summarize here the molecular mechanisms implied in the viral infection and latency, as well as those of the latency-reversing agents so far studied.

**RESUMEN:** Aunque todavía no hay curación para la infección por HIV-1, hay varias estrategias farmacológicas en desarrollo que tienen como objetivo eliminar el reservorio de los virus latentes. Se analizan aquí los mecanismos moleculares implicados en la infección y latencia de los virus HIV, así como aquellos por los que actúan los agentes reversores de latencia estudiados hasta el momento.

\*Corresponding Author: [avendano@ucm.es](mailto:avendano@ucm.es)

Received: April 5, 2017 Accepted: April 5, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 2 (2017), pp. 211-223

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS),<sup>1</sup> detectado por primera vez en 1981, es el desenlace final de una infección originada por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) que favorece el desarrollo de enfermedades oportunistas y de procesos oncogénicos y autoinmunes. Gracias a la actividad de anticuerpos específicos neutralizantes y de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTLs), la respuesta inmune controla la replicación viral en las fases iniciales de la infección, y en algunos infectados no progresa la enfermedad sin tratamiento con terapia antirretroviral (ART). Sin embargo, en la inmensa mayoría la infección progresa y genera un estado de activación del sistema inmune que contribuye a la eliminación de las células diana, los linfocitos T CD4+, y de las vecinas no infectadas. Los órganos linfoides se deterioran y los mecanismos efectores de dicho sistema se alteran, desencadenando la inmunodeficiencia característica de esta enfermedad. Según estimaciones de las Naciones Unidas, en el año 2015 había en el mundo 37 millones de personas infectadas, alrededor de 2 millones se habían infectado por vez primera, y 1,1 millones murieron por problemas relacionados con esta infección.

## 2. EFICACIA Y PROBLEMAS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL Y DE LA PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN

A finales de los años 1990 se descubrió que los virus

HIV-1 pueden permanecer muchos meses o incluso años latentes (ocultos e inactivos), integrados en el genoma de ciertas células del sistema inmune del hospedador, sin ser atacados por las terapias antirretrovirales. Gracias a la eficacia de los antivirales actualmente disponibles administrados en distintas combinaciones, se ha conseguido reducir espectacularmente las tasas de enfermedad y muerte de personas por esta infección, que ha pasado de considerarse una de las pandemias más devastadoras de la historia de la humanidad a convertirse en una enfermedad crónica. Sin embargo, los fármacos antirretrovirales sólo actúan contra los virus que se alojan en células activadas, siendo inactivos contra los reservorios de virus latentes. Por esta razón, la interrupción del tratamiento conduce a un rápido repunte de la viremia, haciendo necesaria la administración de estos fármacos durante toda la vida. Este requisito supone un coste elevado imposible para muchos enfermos, y una obligada adhesión a la terapia con los consiguientes efectos secundarios y la aparición de resistencias.

Por otra parte, aunque la mejor manera de frenar esta enfermedad sería la administración de vacunas preventivas, encontrar una vacuna HIV eficaz es uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la medicina. Esta dificultad se debe fundamentalmente a la heterogeneidad de los virus HIV, con gran diversidad de subtipos y una alta tasa mutacional que favorece la aparición de variantes virales de escape; a la dificultad para encontrar buenos modelos de animales para su ensayo; y a que las vacunas mimetizan la respuesta inmune de los pacientes que superan una enfermedad, pero los anticuerpos que produce la persona infectada por HIV no

<sup>1</sup> En este trabajo se utilizan todas las siglas según la denominación inglesa a excepción de los ácidos nucleicos ADN y ARN.

son capaces de acabar con ella.

En el año 2003 se abandonó por falta de eficacia un ensayo clínico bastante avanzado con la primera vacuna que se probó en humanos. Desarrollada por la empresa VaxGen, se basaba en la proteína de la envuelta vírica gp120, y utilizaba alúmina como adyuvante. El hecho de que la proteína gp120 se administrara en forma monomérica, mientras que en el virus se encuentra como trímero asociada al dominio de transmembrana gp41, se sugirió como posible causa de su fracaso. Otra vacuna denominada V500, basada en un adenovirus de serotipo 5 que poseía fragmentos genéticos de HIV procedentes de varios subtipos, se estudió durante unos 10 años por la compañía Merck en colaboración con un consorcio internacional, pero su desarrollo se suspendió por falta de eficacia en 2007 (1).

En 2009 se atisbó que eran posibles las vacunas HIV preventivas al publicarse los resultados del ensayo clínico RV144 realizado en Tailandia. En él se administró conjuntamente el vector ALVAC-HIV (basado en un vector *canarypox*), proteínas víricas como gp120, y un adyuvante para potenciar la respuesta inmunitaria. El riesgo de adquirir la infección pasó a ser de un 31,2 %, una cifra baja pero estadísticamente significativa. Actualmente se está poniendo en marcha en África del Sur el ensayo HTVN 702 con una versión modificada de esta vacuna, cuyos resultados se esperan a finales de 2020. El proyecto, financiado por la *Pox Protein Public Private Partnership* (P5) de la que forma parte la Fundación Bill & Melinda Gates, ha motivado que la investigación sobre vacunas preventivas anti HIV se contemple con un nuevo optimismo, como se reflejó en la 21<sup>a</sup> *International AIDS Conference* celebrada en Durban en 2016. Los primeros datos sobre seguridad e inmunogenicidad de la vacuna preventiva SAV001, que utiliza un virus genéticamente modificado y desactivado, han sido prometedores (2). También se estudian nuevas aproximaciones, entre las que se encuentra la inmunoprofilaxis con vector (*vectored immunoprophylaxis*). En ésta, se administran virus diferentes al HIV para que en el interior de las células generen anticuerpos ampliamente neutralizantes que podrían atacar a todos los tipos HIV.

En el año 2015, ensayos clínicos con la vacuna terapéutica MVA-B administrada en combinación con antirretrovirales, demostraron que es un buen candidato para mejorar las respuestas inmunes frente al HIV en individuos infectados (3). Esta vacuna se desarrolla dentro del proyecto Eurovac, financiado por la UE desde 1999, con la participación de un equipo dirigido por el Dr. M. Esteban en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC. En ella se utilizan poxvirus, en particular los vectores atenuados MVA-B y NYVAC (MVA, hace referencia a *Modified Vaccinia Ankara* y B al subtipo HIV-B el más frecuente en Europa, mientras que NYVAC hace referencia a *New York vaccinia virus*) (4).

### 3. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA INFECCIÓN Y LATENCIA DE LOS VIRUS HIV

A pesar de los progresos logrados, conseguir la erradicación del virus HIV con fármacos y/o vacunas profilácticas o terapéuticas sigue siendo un objetivo muy difícil, si no imposible. Como ya hemos dicho, HIV es una infección que progresa hasta originar una enfermedad (AIDS), pero antes de que esto ocurra existe un largo periodo “durmiente” (de latencia) en el que el virus se esconde en el ADN de la persona infectada. Como todos los virus, HIV necesita utilizar la maquinaria que contienen determinadas células del hospedador para realizar la mayor parte de los pasos de su ciclo vital. En este caso, las principales células diana son los linfocitos T CD4+, que presentan en su superficie una proteína receptora miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas llamada CD4 (*cluster of differentiation* 4). Aunque el virus también afecta a otras células del sistema inmune innato, exhibe en ellas una menor capacidad de replicación.

El tropismo del HIV está gobernado fundamentalmente por la expresión de un complejo receptor en la superficie de las células diana, a través del cual se produce la interacción entre la membrana viral y la celular y la subsiguiente entrada de subpartículas virales por fusión. Este complejo está formado por la proteína viral gp120, la proteína CD4 anteriormente mencionada y los correceptores CXCR4 ó CC que se encuentran en las células diana. Estos últimos pertenecen a la familia de receptores de citocinas, siendo los más importantes CXCR4 y CCR5. Cuando los linfocitos T CD4+ están activados, tiene lugar en ellos la replicación vírica que, cuando es masiva, lleva aparejada su destrucción y la inactivación del sistema inmune del hospedador.

La entrada del HIV en los linfocitos T CD4+ activados origina distintos procesos bioquímicos: elevación de los niveles del correceptor CCR5 (5), activación de la transcripción reversa mediante un aumento de los depósitos de desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTP), liberación de factores de transcripción como NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) y P-TEFb (*positive transcription elongation factor-b*) (6), y promoción de algunas modificaciones epigenéticas como la desacetilación o metilación de histonas y la metilación del ADN. Tras su entrada por fusión, las subpartículas virales se liberan en el citoplasma y se inicia la transcripción inversa (RT) del ARN viral en ADN parcialmente bicatenario que, junto con ciertas proteínas virales y factores celulares, se transporta al núcleo donde copias completas de ADN de doble cadena se integran en el genoma celular. Estas copias sirven de molde a la ARN polimerasa II que, con la colaboración de ciertas proteínas y factores, producen los ARNs virales. Éstos se exportan después al citoplasma, donde forman estructuras virales inmaduras que se liberan y transforman al mismo tiempo o inmediatamente después en virus maduros.

Una pequeña población de aproximadamente  $1/10^6$  de las células infectadas permanece en un estado durmiente o de reposo (rCD4+), y en ellas, el virus no puede completar la retrotranscripción de su genoma ARN a ADN ni la integración de éste en el del hospedador, por lo que el genoma vírico persiste en su núcleo durante largos periodos de tiempo sin que pueda generarse ni expandirse una progenie viral (7,8). Este fenómeno ocurre muy pocas veces y es más bien un hecho accidental, pero afecta a todos los infectados por HIV siendo la causa más importante que impide su curación.

Los linfocitos rCD4 generan una barrera física de actina cortical que dificulta la entrada de nuevos virus y producen muy pocas proteínas virales o ninguna debido a que en ellos están inactivos muchos programas de transcripción. También es posible que estos linfocitos se sitúen en lugares anatómicos inaccesibles a las TCLs (9,10). Uno de los mecanismos por los que se bloquea la replicación viral consiste en una disminución de los depósitos de dNTP disponibles para que la transcriptasa inversa catalice la síntesis del ADN complementario (cDNA) viral. Esta circunstancia se produce por la activación del factor de restricción SAMHD1, que produce una enzima que hidroliza los desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) y los convierte en fosfato inorgánico (iPPP) y 2'-desoxirribonucleósidos (11).

#### **4. BÚSQUEDA DE AGENTES REVERSORES DE LATENCIA. ESTRATEGIAS SHOCK AND KILL**

Desde hace algunos años se ha explorado la reactivación del reservorio de HIV-1 latente mediante la administración de fármacos dirigidos a contrarrestar los mecanismos por los que éste se genera. Se trata de promover la expresión génica viral en los linfocitos rCD4+ con la esperanza de que estas células infectadas mueran como consecuencia de los efectos citopáticos de los virus y de la respuesta inmune específica natural o inducida (12). La activación global de las células T revierte la latencia, pero es tóxica (13), por lo que se buscan moléculas que no activen a las células T en su conjunto. Si estos nuevos fármacos, denominados agentes reversores de latencia (*latency-reversing agents*, LRA), se combinan con terapias antivirales o con vacunas terapéuticas, los virus reactivados podrían ya multiplicarse, pero no podrían infectar nuevas células (14).

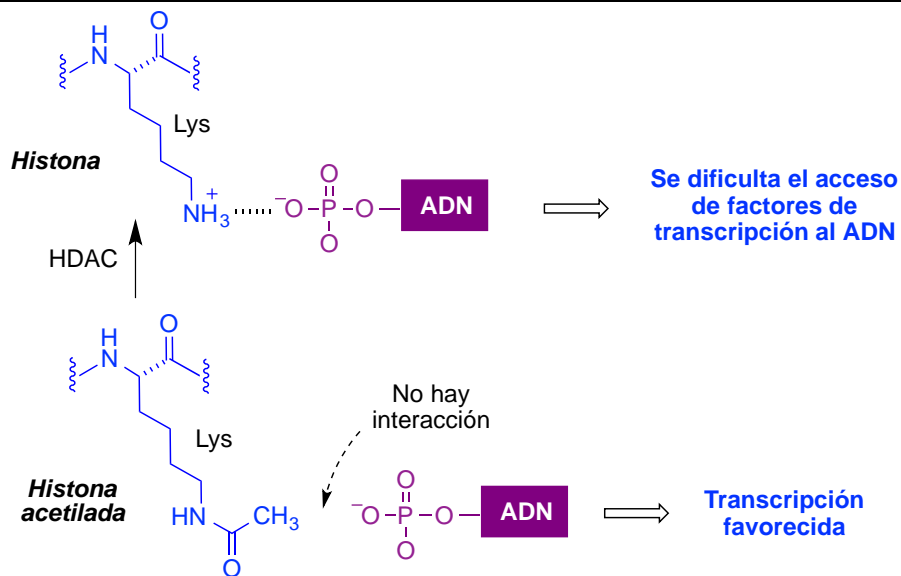
Estas estrategias se denominan *shock and kill* porque tratan de despertar al enemigo, hacerlo salir de su

escondite y matarlo. Con ellas podría ser posible eliminar las cepas resistentes y curar la infección, o al menos lograr remisiones prolongadas libres de tratamiento terapéutico.

Debido a que los linfocitos rCD4+ son muy poco frecuentes in vivo, se han utilizado en estos estudios diversos modelos de latencia HIV-1 in vitro (15); quizás por ello, bastantes resultados han resultado inconsistentes (16,17). Se estima que si no se llega a conseguir la reversión de la latencia se tardarán muchos años en lograr la deseada erradicación del virus (18) por lo que, a pesar de las dificultades, se han estudiado clínicamente varios compuestos para conseguir este propósito. Entre ellos se incluyen inhibidores de desacetilasas de histonas (HDAC) como vorinostat y romidepsina, que funcionan fundamentalmente por mecanismos epigenéticos; disulfiram (Antabuse®), cuyo mecanismo como reversor de la latencia viral parece implicar al factor nuclear NF- $\kappa$ B; o el compuesto JQ1, que también funciona por mecanismos epigenéticos. También se han estudiado algunos agonistas de proteína cinasa C (PKC) como los ésteres de forbol, la prostratina o la briostatina-1; agonistas del receptor TLR9 como lefitolimod; anticuerpos del receptor PD-1 como pembrolizumab; y ciertos fármacos inmunomoduladores (19). La actividad de algunos compuestos con diversas estructuras y mecanismos de acción se ha ido descubriendo también utilizando técnicas de cribado de alto rendimiento (20).

##### *4.1. Inhibidores de histona desacetilasas (HDACS)*

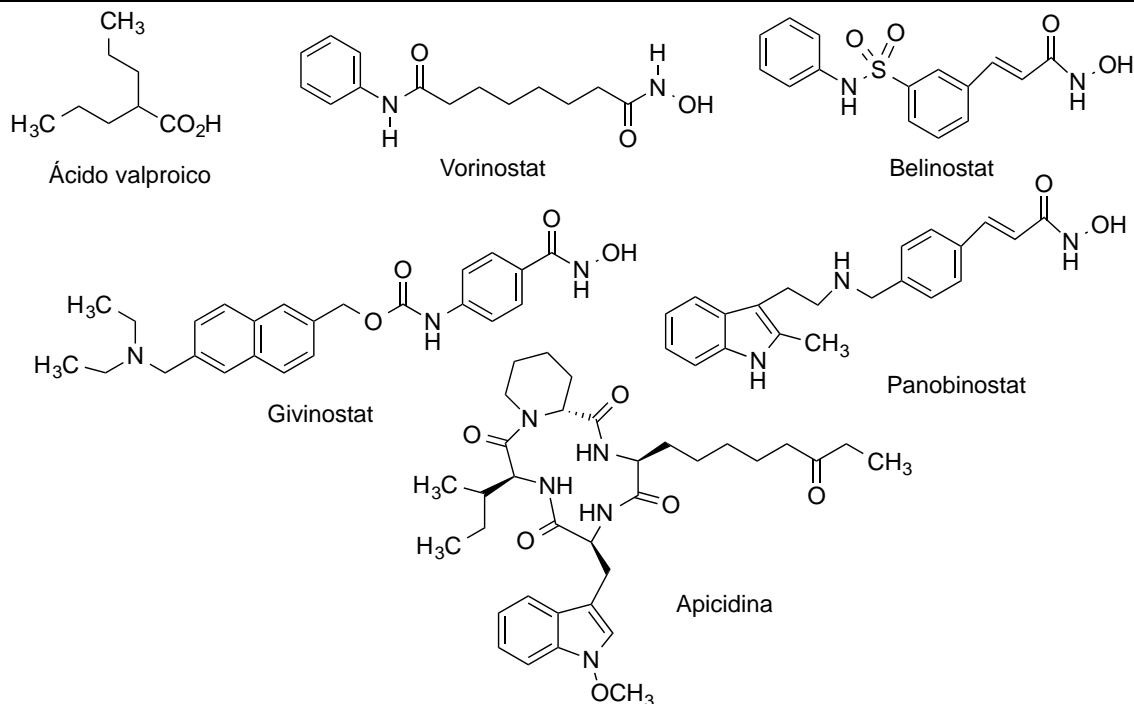
La acetilación de las histonas afecta a la estructura de la cromatina y supone una disfunción en el control epigenético, con alteraciones que conducen a la tumorigénesis o a la apoptosis. Aunque las histonas no interactúan directamente con las polimerasas, su modificación afecta al modo en que el ADN se enrolla, lo que influye en los genes que se expresan. Generalmente, las histonas se encuentran en una forma desacetilada debido a la acción de las HDACs, lo que se asocia a una represión de la transcripción. La acetilación de los grupos  $\epsilon$ -amino de los restos de lisina presentes en estas proteínas, que está catalizada por las acetiltransferasas de histonas (HATs), elimina la basicidad de los grupos amino de dicho aminoácido y por tanto su carga positiva, lo que debilita las interacciones electrostáticas entre las histonas y el ADN facilitando el acceso a éste de los factores de transcripción y de las polimerasas (Figura 1).



**Figura 1. La acetilación de las histonas aumenta la transcripción del ADN.**

Durante la latencia, los factores de transcripción del hospedador reclutan las enzimas HDAC1, HDAC2 y HDAC3, inhibiendo así la transcripción proviral al impedir el enlace de factores cruciales para el inicio de la transcripción vírica. De ahí el interés de los inhibidores

HDAC para su posible desarrollo como agentes reversores de latencia (21) y como agentes anticáncer solos o asociados a fármacos inmunomoduladores (22,23) (ver la Figura 2).



**Figura 2. Ejemplos de inhibidores de HDACs estudiados como LRAs.**

Hay que tener en cuenta que los inhibidores de HDACs no inducen la activación general de las células T ni la secreción de citocinas, y tampoco aumentan los niveles de CD4, CXCR4 o CCR5, pero pueden mostrar efectos secundarios debido a que la modificación de los niveles de acetil-histonas puede alterar la expresión de un gran número de genes. Además, muchos de estos inhibidores

pueden tener otras dianas alternativas; por ejemplo, en la acción de vorinostat como LRA está implicada también la activación de la vía de señalización PI3K/Akt (24).

En el año 2005 el grupo del Dr. David Margolis, un investigador de la Universidad de Carolina del Norte, publicó en la revista *The Lancet* un estudio piloto que tuvo mucha repercusión en la prensa, ya que apuntaba a que la

infección HIV era curable. Este estudio mostraba que la combinación del antiviral enfuvirtida con **ácido valproico**, un anticonvulsivante utilizado para tratar enfermedades neurológicas y psiquiátricas como la epilepsia o el trastorno bipolar, reduce el número de linfocitos T CD4+ durmientes infectados con HIV-1 latentes (25). El equipo de Margolis demostró primero en estudios in vitro, que el ácido valproico estimulaba la liberación de los virus de estas células (26), un efecto que se atribuyó a la inhibición de la enzima HDAC1 inducida por este fármaco. Ésta permitiría la iniciación de la transcripción y la subsiguiente producción de proteínas víricas y viriones, seguida de la muerte celular causada por la citotoxicidad inducida. Paradójicamente, el ácido valproico no activaba a las células T CD4+ durmientes, por lo que no parecía claro cómo se promovía la transcripción del virus. De hecho, el estudio piloto de Margolis provocó reticencias en el

mundo científico (27) hasta que finalmente otro estudio con pacientes tratados con terapia antirretroviral de gran actividad, que recibieron simultáneamente ácido valproico, demostró que su uso en la clínica no ejerce un efecto complementario sobre el deterioro de los reservorios latentes de HIV (28). A pesar de este fracaso, la hipótesis de trabajo no se abandonó y dio paso a la búsqueda de nuevos LRAs inhibidores específicos de HDAC1 (29).

**Vorinostat**, conocido también como SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) o Zolinza®, es un inhibidor de HDACs más selectivo que el ácido valproico que pertenece al grupo de los ácidos hidroxámicos. Éstos inhiben HDACs al actuar como quelantes del átomo de Zn<sup>2+</sup> que participa en la hidrólisis catalizada por estas enzimas de los grupos acetilamino en las histonas acetiladas (Figura 3).

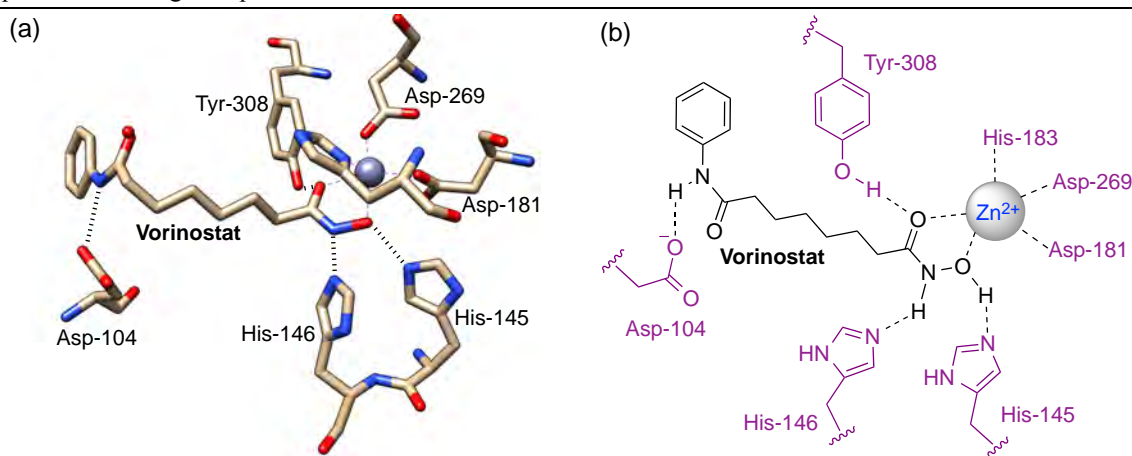


Figura 3. Interacción de vorinostat con el sitio activo de la HDAC2 humana.

Vorinostat se aprobó en 2006 por la FDA (no por la EMA) para el tratamiento de linfoma de células T y de mieloma múltiple. En 2012, Margolis y su grupo comprobaron que este fármaco no solo interrumpe la latencia del virus HIV-1 in vitro, sino que también lo hace en pacientes tratados con terapia antirretroviral (30). Aislado los linfocitos T CD4+ circulantes de ocho pacientes en los que la viremia se había suprimido con estas terapias, se observó que una única dosis de vorinostat aumentaba los biomarcadores de la acetilación e inducía simultáneamente un aumento de 5 veces en el ARN viral expresado en estas células, por lo que este trabajo supuso una prueba de concepto para el posible uso de los inhibidores de HDACs como agentes anti-HIV (31). Ensayos clínicos posteriores corroboraron que tras la interrupción de la terapia antirretroviral, vorinostat induce un aumento significativo de la transcripción de los virus latentes en la mayoría de los pacientes infectados (32). Sus análogos **givinostat** y **belinostat**, y el péptido cíclico **apicidina** (33), también han sido estudiados para reactivar la latencia HIV.

El interés de **romidepsina** como agente reversor de latencia HIV surgió de un estudio in vitro en el que se trataba un modelo de células T latentes con tres

inhibidores de HDACs: el ya citado vorinostat, un análogo denominado **panobinostat** (Farydak®) aprobado en 2015 por la FDA y por la EMA para el tratamiento del mieloma múltiple, y la romidepsina. Esta última, conocida también como compuesto FR901228 o por su nombre comercial Istodax® (34), se aprobó en 2009 por la FDA para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer como la leucemia periférica o cutánea de células T, aunque fue rechazado por la EMA en 2012. En el estudio citado, la actividad de los tres fármacos para revertir la latencia HIV fue paralela a su actividad inhibidora de diversas isoenzimas HDAC humanas, siendo el más potente de los tres la romidepsina. Tras una terapia antirretroviral y 4 horas de exposición a una solución de romidepsina 40 nM, los niveles intracelulares de ARN vírico en los linfocitos T CD4+ aislados de pacientes infectados con HIV, tanto los durmientes como los activos, aumentaron unas 6 veces, y esta expresión persistió durante 48 h. La romidepsina también aumentó los niveles extracelulares de ARN vírico y de los viriones, produciéndose el efecto reversor de la latencia a dosis sustancialmente más bajas que las que se utilizan en oncología (35).

Romidepsina es un depsipéptido que se aisló de la bacteria *Chromobacterium violaceum* procedente de una

muestra de suelo y se desarrolló originalmente por la empresa Fujisawa Pharmaceutical Company, denominada ahora Astellas Pharma. Es un profármaco que se activa por el glutatión en el interior de las células a través de la reducción de su puente disulfuro. La cadena de cuatro

carbonos terminada por uno de los dos grupos SH originados en dicha reducción, forma entonces un enlace covalente con el único residuo de cisteína presente en el bolsillo de la enzima HDAC, inactivándola (Figura 4).

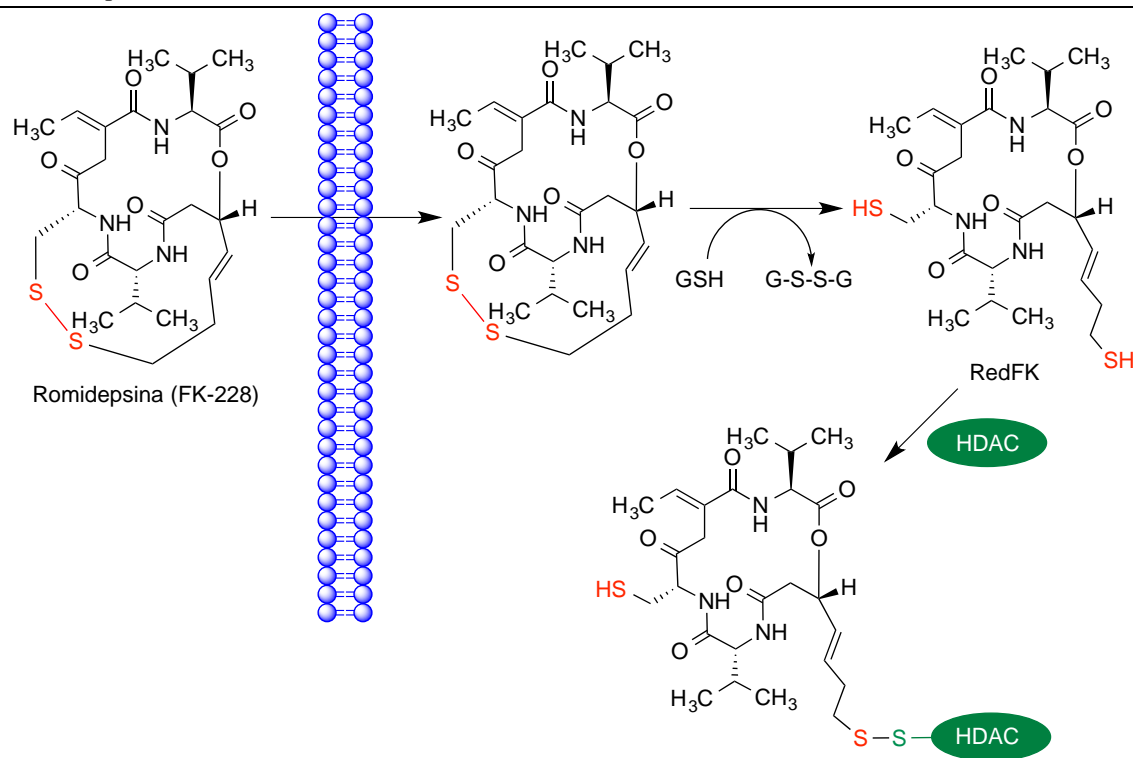


Figura 4. Bioactivación de romidepsina.

Entre los estudios *shock and kill* con romidepsina como LRA mencionaremos los ensayos en fase I/II NCT01933594 realizados en EEUU. En ellos participan infectados por HIV con una carga viral menor de 50 copias/mL tratados con un régimen que contiene efavirenz (Sustiva<sup>®</sup>), raltegravir (Isentress<sup>®</sup>), o dolutegravir (Tivicay<sup>®</sup>), a fin de identificar qué dosis de romidepsina es segura y eficaz para reactivar el HIV latente en los linfocitos rCD4<sup>+</sup> (36). Entre los estudios que utilizan combinaciones de romidepsina con vacunas terapéuticas podemos citar los ensayos REDU I/IIa, realizados en Dinamarca con la vacuna terapéutica Vacc-4x, cuyos resultados se dieron a conocer en la *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* (CROI) celebrada en Boston en 2016. Los participantes, tratados con terapia antirretroviral, recibieron 6 inyecciones de esta vacuna y un adyuvante para aumentar sus propiedades como inmunoestimulante, y 3 semanas después de la última inyección de vacuna recibieron 3 infusiones de romidepsina en 3 semanas. Después de 8 semanas se interrumpió el tratamiento antirretroviral durante 16 semanas, observándose en la mayoría de participantes que la carga viral permanecía por debajo de los niveles detectables en presencia de ART, lo que indicaba que Vacc-4x parece colaborar con el sistema inmune para controlar los virus reactivados (37). En otro ensayo clínico denominado BCN02-Romi, realizado por investigadores

del laboratorio Irsicaixa de Barcelona, se ha combinado romidepsina con MVA.HIVconsy, un vector MVA que contiene el inmunógeno HIVconsy diseñado por investigadores de la Universidad de Oxford (38). Aquí se administró primero una dosis de la vacuna a los 15 participantes que se encontraban en tratamiento antirretroviral y tenían carga viral indetectable; en las semanas 3, 4 y 5 se administraron tres dosis de romidepsina; en la semana 9 otra dosis de vacuna y, después de 8 semanas, se les suprimió la medicación antirretroviral. Las tres infusiones de romidepsina produjeron en todos los participantes menos en uno pequeños eventos de replicación viral acompañados de incrementos temporales en los niveles de linfocitos CD4<sup>+</sup>, que volvieron a la normalidad 3 días después. A pesar de estos repuntes virales derivados de la administración de romidepsina, la cantidad de ADN viral en los reservorios no se alteró significativamente, por lo que su capacidad para reducir el tamaño de los reservorios podría quedar en entredicho. Sin embargo, la actividad de la respuesta inmunitaria celular de los linfocitos CD8 se incrementó tanto tras la administración de la vacuna como tras la infusión de romidepsina, y pasó de ser muy amplia (frente a todas las proteínas del HIV) a centrarse en las regiones altamente conservadas del virus, lo que apuntaría hacia un buen funcionamiento de la vacuna. De los 15 participantes, 13 llegaron a la fase de interrupción del tratamiento



antirretroviral pero, en 8 de los 13 casos, el rebote virológico se produjo dentro de las 4 primeras semanas tras la interrupción y volvieron al tratamiento antirretroviral. En los 5 participantes restantes, la carga viral solo repuntó de forma intermitente a bajos niveles para volver después a niveles indetectables. Tras 6, 12, 19, 20 y 28 semanas sin recibir tratamiento antirretroviral, todos ellos continuaron con el virus bajo control (39). Los resultados de este estudio son prometedores, aunque arrojan numerosos interrogantes que los investigadores deberán ir resolviendo, tanto a través de un análisis de los resultados como a la realización de nuevos ensayos clínicos.

#### 4.2. Disulfiram (antabuse®)

Este fármaco, utilizado para controlar el alcoholismo por inhibir la enzima acetaldehído deshidrogenasa (Figura 5), es además un inhibidor PTEN. Ésta es una fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa que regula negativamente los niveles de PIP3 y funciona como un supresor de tumores. Hace varios años, el laboratorio del Dr. Siliciano en la *Johns Hopkins University* encontró que disulfiram podría revertir la latencia HIV, lo que motivó la puesta en marcha de un estudio piloto con pacientes HIV positivos sometidos a terapia ART. En éste se encontró que una dosis diaria de 500 mg de disulfiram mostraba cierta actividad. Otro ensayo clínico utilizó dosis superiores, de 2000 mg/día, administradas a 30 pacientes seropositivos tratados con ART. La administración de disulfiram durante un corto periodo de tiempo produjo un aumento de ARN viral asociado a las células (40) consistente con una reversión de la latencia, lo que hace suponer que se realizarán más estudios para corroborar el interés de este fármaco como un LRA, ya que no induce activación general de las células T ni liberación de citocinas (41).

#### 4.3. Agonistas PKC

Si se induce la translocación al núcleo de factores de transcripción por activación de ciertas vías de señalización, se evita que aquellos permanezcan secuestrados en el citoplasma. Los agonistas de la proteína cinasa C (PKC)

pueden reactivar los virus HIV-1 latentes induciendo la translocación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la vía de señalización AP-1 (*activator protein 1*). NF- $\kappa$ B es un factor que regula la expresión génica en respuesta al estrés ambiental, la radiación y los factores de crecimiento.

Un gran número de agonistas PKC son diterpenos en los que el hidroxilo en la posición 13 del forbol está esterificado. Estos compuestos se enlazan a la región reguladora de estas enzimas en el mismo lugar que su ligando fisiológico, el diacil glicerol. Los más conocidos son los productos naturales **forbol 12-miristato-13-acetato (PMA)**, **12-desoxiforbol-13-fenilacetato (DPP)** (42), y **prostratina (12-desoxiforbol-13-acetato)**. Esta última, aislada de la corteza del árbol *Homalanthus nutans* (tradicionalmente utilizada por los curanderos de Samoa para tratar la hepatitis), ha sido objeto de varios estudios junto con sus análogos sintéticos (43). Los ensayos clínicos con agonistas PKC requieren una evaluación estricta de su toxicidad, porque pueden activar la transcripción de varias citocinas. Por ejemplo, la **briostatina-1**, un macrólido cíclico aislado del organismo marino *Bugula neritina* originalmente evaluado frente a varios tipos de cáncer, se ha investigado como un adyuvante en la enfermedad de Alzheimer por su implicación en la formación y activación de las sinapsis y como reversor de la latencia HIV por ser un potente activador del factor NF- $\kappa$ B a través de la activación de PKCs (44). Desafortunadamente, briostatina-1 es demasiado tóxica para su uso clínico (Figura 6).

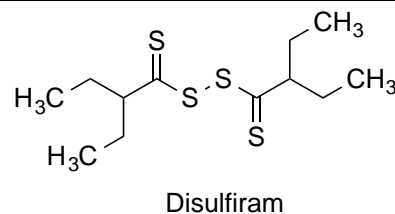
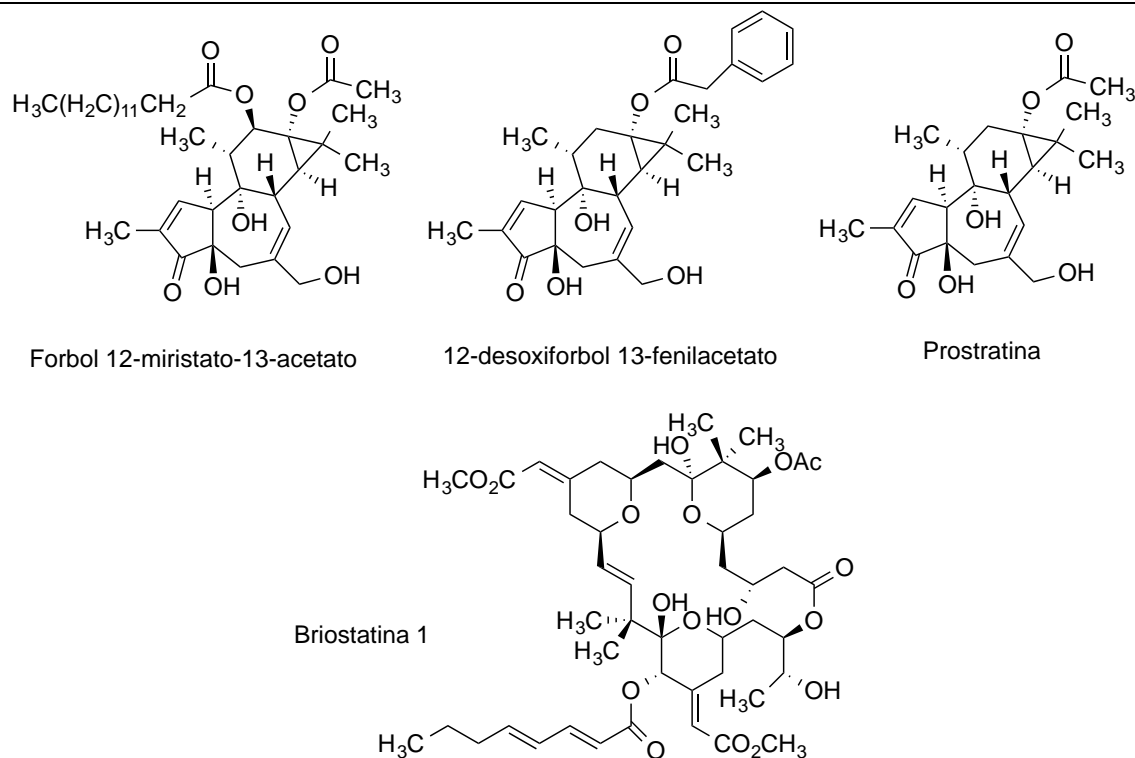


Figura 5. Estructura de disulfiram.

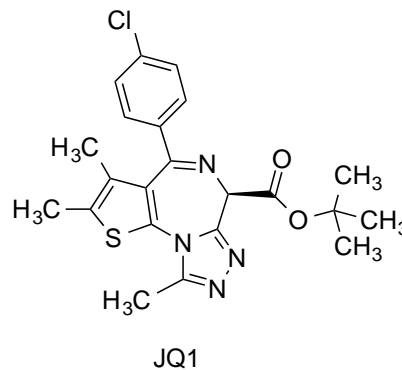


**Figura 6. Agonistas PKC estudiados como agentes reversiones de latencia.**

Otros diterpenos, en su mayoría productos naturales extraídos de plantas de la familia *Euphorbia*, reversion también la latencia HIV (45).

#### 4.4. Inhibidores BRD4. JQ1

Los residuos de lisina acetilados de la cromatina y de otras proteínas son lugares de reconocimiento y enlace específicos de proteínas epigenéticas “lectoras” que contienen porciones denominadas bromodominios (BRDs) y constituyen la familia BET (*bromodomain extra-terminal*). En esta familia es particularmente importante la isoforma BRD4, un bromodominio que promueve el reclutamiento del factor B de elongación transcripcional positiva (P-TEFb) (46), que está implicado en la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II (RNAPII) esencial para que esta enzima catalice la elongación del ARNm y se biosinteticen proteínas como c-Myc. Cuando BRD4 se inhibe por compuestos como JQ1 se desactiva la transcripción del ADN (Figura 7) (47).



**Figura 7. Estructura del fármaco JQ1.**

Desarrollado inicialmente como un fármaco anticáncer, se observó después que también reactiva los provirus HIV-1 latentes y puede inducir brotes de virus en células T CD4<sup>+</sup> durmientes procedentes de pacientes tratados con ART. JQ1 podría revertir la latencia del virus en terapias de combinación porque suprime la expresión de los genes que activan a las células T y aumenta la actividad de la proteína Tat (*Trans-Activator of Transcription*) del virus HIV-1, incrementando el nivel de transcripción del ARN bicatenario (48).

#### 4.5. Agonistas de receptores TLR

Los receptores *toll-like* (TLRs) son glicoproteínas con un dominio extracelular responsable del reconocimiento de sus ligandos, una hélice de transmembrana, y un dominio intracelular (*Toll-like/IL-1 receptor*) responsable de la señalización. Estos receptores están implicados en las respuestas inflamatorias y en la iniciación de la respuesta



inmune innata y adquirida, teniendo un importante papel de defensa frente a diversos patógenos debido a que reconocen una serie de patrones moleculares asociados a ellos. Varios agonistas de estos receptores tienen la capacidad de promover la replicación viral activando el factor NF- $\kappa$ B. Entre ellos se encuentran la proteína globular **flagelina** que es reconocida por TLR5,

**resiquimod** (denominado también compuesto R-848) que es reconocido por TLR7 y TLR8, agonistas de TLR7 como **vesatolimod** (GS-9620, evaluado también frente a hepatitis B, Figura 8), y varios oligodesoxinucleótidos con motivos CpG que son reconocidos por el receptor TLR9 localizado en el retículo endoplásmico de las células dendríticas plasmocitoides y de las células B (49).

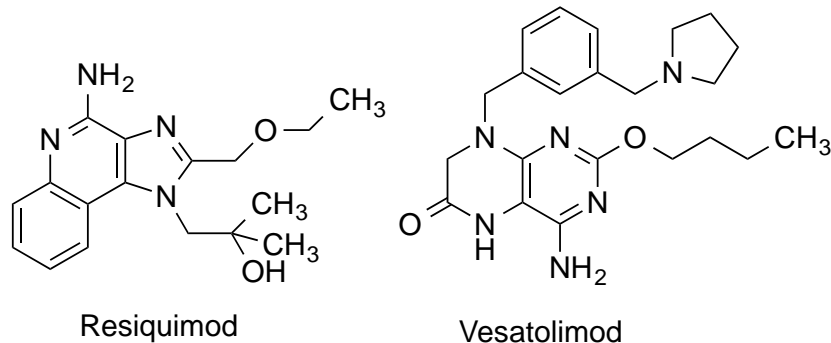


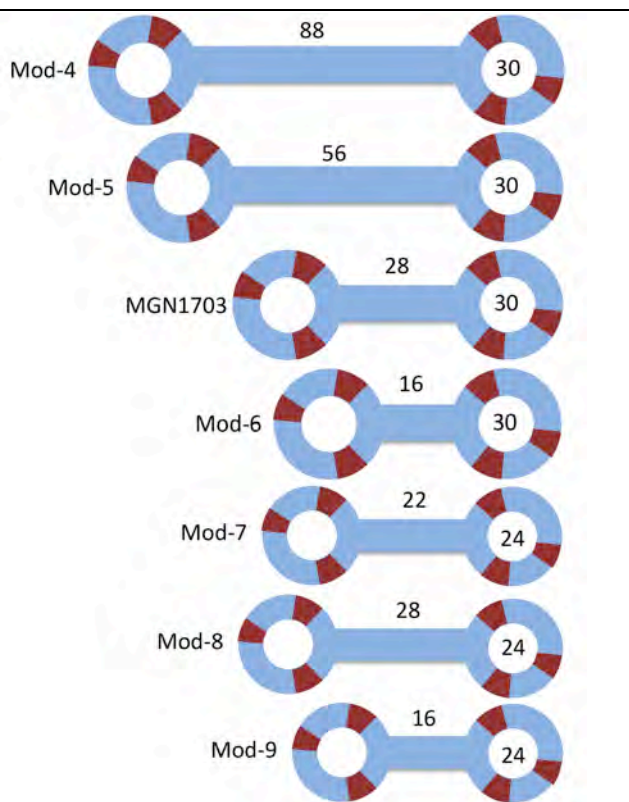
Figura 8. Estructuras de algunos agonistas de receptores TL reversores de latencia.

**Lefitolimod**, un agonista del receptor TLR9 conocido también como MGN1703, es un novedoso agente reversor de latencia perteneciente a una familia de compuestos denominada **dSLIM<sup>®</sup>** (*double Stem Loop Immunomodulator*). Su desarrollo está patrocinado por la Universidad de Aarhus (Dinamarca) y por la compañía biotecnológica alemana Mologen AG, especializada en el desarrollo de fármacos innovadores en el campo de la oncología y de las enfermedades infecciosas.

Lefitolimod se desarrolla actualmente para el tratamiento del carcinoma colorectal, carcinoma de pulmón de células pequeñas y otros tumores avanzados, solo o en combinación con el anticuerpo inmunomodulador ipilimumab (Yervoy<sup>®</sup>), aprobado en 2011 por la FDA y la EMA para el tratamiento del melanoma metastático y en estudio para otros tipos de cáncer. También se investiga en infecciones por HIV. Los resultados preliminares del estudio NCT02443935 (50) indicaron que lefitolimod es inocuo para las personas seropositivas. El estudio TEACH (*Toll-like receptor 9 enhancement of antiviral immunity in chronic HIV infection*) comenzó en junio de 2015 para investigar si puede activar el sistema inmune innato y adquirido en pacientes HIV-positivos y aumentar la destrucción de las células infectadas. La empresa ha anunciado en la *Annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* (CROI) celebrada en febrero de 2017 en Seattle (EEUU) que, al igual que otros LRA, lefitolimod activa durante la terapia antirretroviral las células asesinas naturales (*natural killer cells*, NK) en pacientes HIV positivos (51), las células dendríticas plasmocitoides (pDC), y las células T, por lo que podría jugar un papel en la erradicación del HIV por estrategias *shock and kill*.

El diseño y las características estructurales de este fármaco merecen un ligero comentario (52). Se trata de un oligonucleótido que contiene motivos en los que un nucleótido de citosina va seguido por uno de guanina en la

dirección 5'-C-fosfato-G-3' (*CpG sites*). Estas subestructuras, que se encuentran con frecuencia en bacterias y virus, pueden ser reconocidas por el receptor TLR9 y sirven para detectar infecciones víricas intracelulares. La baja estabilidad metabólica de los oligonucleótidos requiere que en el diseño de fármacos que los imiten se modifique su esqueleto, por ejemplo cambiando los grupos fosfato por grupos tiofosfato, pero con ello se introduce la correspondiente toxicidad. En el caso de lefitolimod, se diseñaron moléculas de ADN de una sola hebra cerradas covalentemente (dSLIM<sup>®</sup>), con dos lazos que contienen motivos C-G que están conectados con un vástago de doble hebra, sin incorporar ningún componente no natural. La eficacia inmunomoduladora de los compuestos dSLIM<sup>®</sup> depende de su forma y tamaño, siendo el más potente MGN1703 (lefitolimod). En éste, el vástago contiene 28 pares de bases y cada lazo 30 nucleótidos entre los que hay tres pares C-G. Cualquier variación en la longitud del vástago y en el tamaño del lazo reduce la potencia (Figura 9).



**Figura 9. Representación esquemática de lefitolimod (MGN1703) y otros compuestos de la familia dSLIM® (double stem loop immunomodulators).** Las porciones en rojo de los lazos representan pares C-G.

Para su evaluación, se utilizaron primero como sistemas modelo células específicas de distinto origen, confirmándose después los datos empleando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores sanos. Algunos estudios de *binding* sugieren que la interacción de TLR-9 con porciones de ADN requiere que éste sea de una sola hebra. Si fuera así, los ADNs de doble hebra bacterianos se tendrían que degradar primero en los endosomas, gracias a sus condiciones ácidas, para dar múltiples fragmentos de una sola hebra con el motivo CG, y éstos serían la señal reconocida por TLR-9 para su traducción.

En el caso de MGN1703, los motivos C-G localizado en los lazos de una sola hebra pueden interaccionar directamente con TLR-9 estimulando la secreción de citocinas (interferones IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e interleucinas IL-12, IL-6, e IL-2) y activando las células inmunes por aumento de la expresión de CD80, CD40, y otras proteínas implicadas en diversas vías de señalización.

#### 4.6. Anticuerpos PD-1. Pembrolizumab

Varios anticuerpos se están estudiando como posibles agentes reversiones de latencia HIV (53). El receptor PD-1, expresado normalmente en las células T, está sobreexpresado cuando estas células son disfuncionales. La función promotora de inmunidad de las células T se restablece con anticuerpos que bloqueen la interacción de dicho receptor con sus ligandos PD-L1 y PD-L2. Como los

linfocitos CD4<sup>+</sup> infectadas con virus latentes también suelen expresar PD-1, estos anticuerpos podrían revertir la latencia viral. Este es el caso de pembrolizumab (lambrolizumab, MK-3475, Keytruda®), un anticuerpo monoclonal (mAb) muy selectivo para el receptor PD-1 que se aprobó por la FDA en 2014 contra el melanoma metastásico y está siendo evaluado en ensayos clínicos con pacientes HIV (54).

## 5. CONCLUSIONES

La reversión de la latencia requerirá probablemente el uso de diversas combinaciones de fármacos, según parecen demostrar ensayos *ex vivo* en los que se cuantifica la producción de ARNm intracelular de HIV-1 y la producción de viriones. En una de estas combinaciones podrían utilizarse agonistas PKC con JQ1 o con inhibidores de HDA (55). Varias revisiones sobre este tema señalan los progresos logrados en el conocimiento de los mecanismos celulares implicados en la latencia viral, así como los esfuerzos realizados para evaluar el tamaño y la composición del reservorio latente y caracterizar y desarrollar anticuerpos y linfocitos T citolíticos que neutralicen múltiples subtipos de virus HIV-1. También es de interés el desarrollo de modelos animales para el estudio de la latencia HIV y de estrategias terapéuticas que conduzcan a su erradicación (56). Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos con combinaciones de vacunas inductoras de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, anticuerpos monoclonales neutralizantes de amplio espectro de acción y activadores del reservorio viral. Es predecible que en los próximos años se establecerán protocolos que reduzcan el tamaño de estos reservorios, lo que abrirá esperanzas a la eliminación del HIV en los pacientes infectados.

## 6. REFERENCIAS

1. a) Esteban M. Desarrollo de vacunas contra el VIH/SIDA. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2007; 73: 1047-78. b) Di Pilato M, Mejías-Pérez E, Zonca M, *et al.* NF $\kappa$ B activation by modified vaccinia virus as a novel strategy to enhance neutrophil migration and HIV-specific T-cell responses. *PNAS* 2015; 112: E1333-42.
2. Choi E, Michalski CJ, Choo SH, *et al.* First Phase I human clinical trial of a killed whole-HIV-1 vaccine: demonstration of its safety and enhancement of anti-HIV antibody responses. *Retrovirology* 2016; 13: 82.
3. a) Mothe B, Climent N, Plana M, *et al.* Safety and immunogenicity of a modified vaccinia Ankara-based HIV-1 vaccine (MVA-B) in HIV-1-infected patients alone or in combination with a drug to reactivate latent HIV-1. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 1833-42. b) Gómez CE, Perdiguerro B, García-Arriaza J, *et al.* A Phase I Randomized Therapeutic MVA-B Vaccination Improves the Magnitude and Quality of the T Cell Immune Responses in HIV-1-Infected Subjects on HAART. *PLoS One* 2015; 10: e0141456. c) Rallon NI, Mothe B, Lopez Bernaldo de Quiros JC, *et al.* Balance between activation and regulation of HIV-specific CD8 T cells response after MVA-B

- therapeutic vaccination. *AIDS* 2015; 30: 553-62.
4. Sánchez-Sampedro L, Perdiguero B, Mejías-Pérez E, García-Arriaza J, Di Pilato M, Esteban M. The Evolution of Poxvirus Vaccines. *Viruses* 2015; 7: 1726-1803.
  5. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 1925-30.
  6. Cary DC, Fujinaga K, Peterlin BM. Molecular mechanisms of HIV latency. *J Clin Invest*. 2016; 126: 448-54.
  7. Harris RS, Hultquist JF, Evans DT. The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J Biol Chem*. 2012; 287: 40875-83.
  8. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med*. 1995;1(12):1284-1290.
  9. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, *et al*. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278: 1295-300.
  10. Siliciano JD, Siliciano RF: A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications. *J Antimicrob Chemother* 2004, 54: 6-9.
  11. Pan X, Baldauf H-M, Keppler OT, Fackler OT. Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4+ T lymphocytes. *Cell Res*. 2013; 23: 876-85.
  12. Xing S, Siliciano RF. Targeting HIV latency: pharmacologic strategies toward eradication. *Drug Discov Today* 2013; 18: 541-51.
  13. Prins JM, Jurriaans S, van Praag RM, *et al*. Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13: 2405-10.
  14. a) Siliciano RF, Greene WC. HIV Latency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011; 1: a007096. b) Rasmussen TA, Tolstrup M, Winckelmann A, Ostergaard L, Søgaard OS. Eliminating the latent HIV reservoir by reactivation strategies. *Hum Vaccin Immunother*. 2013; 9: 790-9.
  15. Yang HC, Xing S, Shan L, *et al*. Small-molecule screening using a human primary cell model of HIV latency identifies compounds that reverse latency without cellular activation. *J Clin Invest*. 2009; 119: 3473-86.
  16. Bullen CK, Laird GM, Durand ChM, *et al*. Novel ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat Med*. 2014; 20: 425-9.
  17. Shan L, Deng K, Shroff NS, *et al*. Stimulation of HIV-1-Specific Cytolytic T Lymphocytes Facilitates Elimination of Latent Viral Reservoir after Virus Reactivation. *Immunity* 2012; 36: 491-501.
  18. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, *et al*. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003; 9: 727-8.
  19. Delagrèverie HM, Delaugerre C, Lewin SR, *et al*. Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents. *Open Forum Infect Dis*. 2016; 3: ofw189.
  20. a) Micheva-Viteva S, Kobayashi Y, Edelstein LC, *et al*. High-throughput screening uncovers a compound that activates latent HIV-1 and acts cooperatively with a histone deacetylase (HDAC) inhibitor. *J Biol Chem*. 2011; 286: 21083-91. b) Xing S, Bhat S, Shroff NS, *et al*. Novel structurally related compounds reactivate latent HIV-1 in a Bcl-2-transduced primary CD4+ T cell model without inducing global T cell activation. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 398-403.
  21. Matalon S, Rasmussen TA, Dinarello CA. Histone deacetylase inhibitors for purging HIV-1 from the latent reservoir. *Mol Med*. 2011; 17: 466-72.
  22. Ver por ejemplo: Hideshima T, Cottini F, Ohguchi H, *et al*. Rational combination treatment with histone deacetylase inhibitors and immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2015; 5: e312.
  23. Li H, Wu X. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-Myc and release of the repression of c-Myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochem and Biophys Res Commun*. 2004; 324: 860-7.
  24. Contreras X, Schwenecker M, Chen CS, *et al*. Suberoylanilide hydroxamic acid reactivates HIV from latently infected cells. *J Biol Chem*. 2009; 284: 6782-9.
  25. Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, *et al*. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet* 2005; 366: 549-55.
  26. Ylisastigui L, Coull JJ, Rucker VC, *et al*. Polyamides reveal a role for repression in latency within resting T cells of HIV-infected donors. *J Infect Dis*. 2004; 190: 1429-37.
  27. Smith SM. Valproic acid and HIV-1 latency: beyond the sound bite. *Retrovirology* 2005; 2: 56.
  28. Siliciano JD, Lai J, Callender M, *et al*. Stability of the Latent Reservoir for HIV-1 in Patients Receiving Valproic Acid. *J Infect Diseases* 2007; 195: 833-6.
  29. Schooley RT, Mellors JW. No Cure Yet for HIV-1, But Therapeutic Research Presses On. *J Infect Diseases* 2007; 195: 770-2.
  30. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, *et al*. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 2012; 487: 482-5.
  31. Margolis DM. Histone deacetylase inhibitors and HIV latency. *Curr Opin HIV AIDS* 2011; 6, 25-9.

32. Elliott JH, Wightman F, Solomon A, *et al.* Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog.* 2014; 10: e1004473.
33. Lin S. HIV-1 reactivation induced by apicidin involves histone modification in latently infected cells. *Curr HIV Res.* 2011;9:202–208
34. Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exper. Cell Res.* 1998; 241: 126-33.
35. Wel DG, Chiang V, Fyne E, *et al.* Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin Induces HIV Expression in CD4 T Cells from Patients on Suppressing Antiretroviral Therapy at Concentrations Achieved by Clinical Dosing. *PLOS Pathogens* 2014; 10: e1004071.
36. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). A Phase I/II Study of Single Dose Romidepsin in HIV-Infected Adults With Suppressed Viremia on Antiretroviral Therapy to Assess Safety, Tolerability, and Activation of HIV-1 Expression. *ClinicalTrials.gov*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Registered on August 28, 2013. NLM Identifier: NCT01933594.
37. Bionor Immuno AS. An Open Phase I/IIa Study to Evaluate the Safety and Effect of Therapeutic HIV-1 Immunization Using Vacc-4x/rhuGM-CSF, and HIV-1 Reactivation Using Romidepsin, on the Viral Reservoir in Virologically Suppressed HIV-1 Infected Adults on cART. *ClinicalTrials.gov*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Registered on March 3, 2014. NLM Identifier: NCT02092116.
38. IrsiCaixa. An Open Label Phase I Trial to Evaluate the Safety and Effect of HIVconsV Vaccines in Combination With Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin on the Viral Rebound Kinetic After Treatment Interruption in Early Treated HIV-1 Infected Individuals (BCN02-Romi). *ClinicalTrials.gov*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Registered on November 9, 2015. NLM Identifier: NCT02616874.
39. Mothe B *et al.* Viral control induced by HIVconsV vaccines & romidepsin in early treated individuals. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2017), Seattle, abstract 119LB, 2017.
40. Julian H Elliott JH, McMahon JH, Chang CC, *et al.* Short-term administration of disulfiram for reversal of latent HIV infection: a phase 2 dose-escalation study. *The Lancet* 2015; 2: 520-9.
41. Xing S, Bullen CK, Shroff NS, *et al.* Disulfiram reactivates latent HIV-1 in a Bcl-2-transduced primary CD4+ T cell model without inducing global T cell activation. *J Virol.* 2011; 85: 6060-4.
42. Bocklandt S, Blumberg PM, Hamer DH. Activation of latent HIV-1 expression by the potent antitumor promoter 12-deoxyphorbol 13-phenylacetate. *Antiviral Res.* 2003; 59: 89-98.
43. a) Korin YD, Brooks DG, Brown S, Korotzer A, Zack JA. Effects of prostratin on T-cell activation and human immunodeficiency virus latency. *J Virol.* 2002; 76: 8118-23. b) Williams SA, Chen LF, Kwon H, *et al.* Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kB. *J Biol Chem.* 2004; 279: 42008-17. c) Wender PA, Kee JM, Warrington JM. Practical synthesis of prostratin, DPP, and their analogs, adjuvant leads against latent HIV. *Science* 2008; 320: 649-52.
44. a) Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Zhang R, *et al.* Bryostatin modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PLoS One* 2010; 5: e11160. b) Pérez M, de Vinuesa AG, Sanchez-Duffhues G, *et al.* Bryostatin-1 synergizes with histone deacetylase inhibitors to reactivate HIV-1 from latency. *Curr HIV Res.* 2010; 8: 418-29. c) DeChristopher BA, Loy BA, Marsden MD, *et al.* Designed, synthetically accessible bryostatin analogues potently induce activation of latent HIV reservoirs in vitro. *Nature Chem.* 2012; 4: 705-10.
45. Abreu CM, Price SL, Shirk EN, *et al.* Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: inhibition of de novo infection and activation of viral LTR. *PLoS One* 2014; 9: e97257.
46. (a) Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; 468: 1067-73. (b) Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature Rev Drug Discov* 2014; 13: 337-56. (c) Gallenkamp D, Gelato K A, Haendler B, Weinmann H. Bromodomains and Their Pharmacological Inhibitors. *ChemMedChem* 2014; 9: 438-64. (d) Sánchez R, Meslamani J, Zhou MM. The bromodomain: from epigenome reader to druggable target. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839: 676-85.
47. Avendaño C. BET inhibitors. The odd compound (+)-JQ1. *An R Acad Farm.* 2015; 81: 214-20.
48. Zhu J, Gaiha GD, John SP, *et al.* Reactivation of Latent HIV-1 by Inhibition of BRD4. *Cell Rep.* 2012; 2: 807-16.
49. a) Scheller C, Ullrich A, McPherson K, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides activate HIV replication in latently infected human T cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 21897-902. b) Thibault S, Imbeault M, Tardif MR, Tremblay MJ. TLR5 stimulation is sufficient to trigger reactivation of latent HIV-1 provirus in T lymphoid cells and activate virus gene expression in central memory CD4+ T cells. *Virology* 2009; 389: 20-5. c) Schlaepfer E, Speck RF. TLR8 activates HIV from latently infected cells of myeloid-monocytic origin directly via the MAPK pathway and from latently infected CD4+ T cells in directly via TNF- $\alpha$ . *J Immunol.* 2011; 186: 4314-24.

50. Toll-like Receptor 9 Enhancement of Antiviral Immunity in Chronic HIV-1 Infection: a Phase Ib/IIa Trial. In: ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Registered on April 30, 2015. NLM Identifier: NCT02443935.
51. Garrido C, Spivak AM, Soriano-Sarabia N, *et al.* HIV Latency-Reversing Agents Have Diverse Effects on Natural Killer Cell Function. *Front Immunol.* 2016; 7: 356.
52. Schmidt M, Hagner N, Marco A, *et al.* Design and Structural Requirements of the Potent and Safe TLR-9 Agonistic Immunomodulator MGN1703. *Nucleic Acid Therapeutics* 2015; 25: 130-40.
53. Halper-Stromberg A, Nussenzweig MC. Towards HIV-1 remission: potential roles for broadly neutralizing antibodies. *J Clin Invest.* 2016; 126: 415-23.
54. a) Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443: 350-4. b) Eron JJ, Gay C, Bosch RJ, *et al.* Safety, immunologic and virologic activity of anti-PD-L1 in HIV-1 participants on ART. Abstract 25. In: Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections CROI 2016, 22-25 February 2016, Boston, USA.
55. a) Pandeló D, Bartholomeeusen K, Delvecchio R, *et al.* Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. *Virology* 2014; 462-463: 328-39. b) Laird GM, Bullen CK, Rosenbloom DIS, *et al.* Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *J Clin Invest.* 2015; 125: 1901-12. c) Darcis G, Kula A, Bouchat S, *et al.* An in-depth comparison of latency-reversing agent combinations in various in vitro and ex vivo HIV-1 latency models identified Bryostatin-1 + JQ1 and Ingenol-B + JQ1 to potently reactivate viral gene expression. *PLoS Pathog.* 2015; 11: e1005063.
56. a) Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the effort to cure HIV infection: going beyond N = 1. *J Clin Invest.* 2016; 126: 409-14. b) Garcia JV. In vivo platforms for analysis of HIV persistence and eradication. *J Clin Invest.* 2016; 126: 424-31.





# Reproduction and brain. I Morphofunctional basis of brain control: advances and therapeutical implications

**Title in Spanish:** *Reproducción y cerebro. I. Bases morfofuncionales del control cerebral: avances y dilemas*

A. Toledano-Díaz<sup>1,\*</sup>, MI Álvarez<sup>2</sup>, A. Toledano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Reproducción, INIA. Madrid. <sup>2</sup>Instituto Cajal, CSIC. Madrid. <sup>3</sup>Académico correspondiente de la RANF.

**ABSTRACT:** For many years, the control of reproduction has been considered a brain function, being the hypothalamus the CNS region directly involved. The main neurons described in recent years related to reproduction are the secretory neurons of GnRH, GnIH and Kisspeptine (gonadotropin-releasing hormone; the gonadotropin-inhibitory hormone and by the peptide Kisspeptine- GnRH regulatory neurons), but it is still unknown whether other pituitary gonadotropin regulatory peptides exist as well as other neurons (or peptides) that produce regulatory factors for these neurons. It is known that these neurons are formed by subsets that can secrete other substances and/or be regulated in different ways. The great variability of the synaptic connections and the secretion of neuropeptides seem to indicate that it is necessary to know the specific "functional modality" (or specific picture of a situation in an individual of a species) rather than the cells involved in a process. The complex interrelationship of the morphofunctional subtypes of secretory and non-secreting neurons of the different nuclei or areas of the hypothalamus related to reproduction raises doubts about the therapeutic performance. Possible pharmacological and non-pharmacological treatments, specifically stimulating some neuronal types, may have important side effects by disregarding collateral connections to other systems or by ignoring the existence of neurons of a subtype in other functional "axes" of the hypothalamus.

**RESUMEN:** Desde hace muchos años se considera que el control de la reproducción radica en el cerebro y que el hipotálamo es la región del SNC directamente implicada en esta función. Las principales neuronas descritas en los últimos años relacionadas con la reproducción son las neuronas secretoras de GnRH, GnIH y Kisspeptina (neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropina, la hormona inhibidora de las neuronas GnRH y las neuronas reguladoras de GnRH mediante el péptido Kisspeptina), pero todavía se desconoce si existen otros péptidos reguladores de las gonadotropinas hipofisarias así como de otras neuronas (o péptidos) que producen factores controladores de estas neuronas. Sí se sabe que estas neuronas están formadas por subconjuntos que pueden secretar otras sustancias y/o ser reguladas de diferente manera. La gran variabilidad de las conexiones sinápticas y la secreción de neopéptidos parece indicar que es necesario conocer la "modalidad funcional" específica (o cuadro específico de una situación en un individuo de una especie) más que las células intervinientes en un proceso para establecer terapias. La compleja interrelación de los subtipos morfofuncionales de las neuronas secretoras y no secretoras de los diferentes núcleos o áreas del hipotálamo relacionadas con la reproducción plantea dudas sobre la actuación terapéutica. Posibles tratamientos farmacológicos y no farmacológicos, estimulando "específicamente" algunos tipos neuronales, pueden tener consecuencias adversas al desestimar conexiones colaterales a otros sistemas o desconocer la existencia de neuronas de un subtipo en otros "ejes" funcionales del hipotálamo, con lo que se podrían inducir fenómenos secundarios de gran transcendencia.

\*Corresponding Author: toledano@inia.es

Received: April 23, 2017 Accepted: May 7, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 2 (2017), pp. 224-240

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se están produciendo importantes avances científicos en el campo de la reproducción, siendo los más interesantes y con mayor repercusión en diversos ámbitos los relacionados con el control de este trascendental proceso que caracteriza la vida (nacer, crecer, reproducirse y morir). No solo estamos haciendo mención a la Medicina Reproductiva Humana, en la que se

cuestiona hasta donde la bioética puede permitir controlar un proceso más allá de donde las capacidades humanas pueden tutelar el fruto de la reproducción, sino también a la Reproducción Animal, en donde los retos son el mantener y recuperar las especies en vías de extinción (y las especies protegidas) así como facilitar la mejora de las especies ganaderas, el mantenimiento de nuestros recursos alimentarios y el bienestar de nuestros animales de



compañía, que no hay que olvidar que también son una terapia humana para muchos enfermos mentales y acompañantes casi necesarios en la vida cotidiana de las personas que viven en soledad o en las edades avanzadas.

Desde hace muchas décadas está completamente asentada la convicción de que el control de la reproducción, como el de casi todas las funciones que llevan a cabo los sistemas de los vertebrados (mantenimiento del medio interno, alimentación, vigilia-sueño, desarrollo-involución, etc.) está regulado por el Sistema Nervioso Central (SNC), que, jerárquicamente, ocupa una primacía reguladora en el complejo sistema de interregulación de todos los sistemas que componen el ser vivo (1, 2). El SNC no solo recibe y prepara las respuestas a las diversas informaciones que se reciben del exterior (calor, frío, agresiones, situaciones desagradables y placenteras del entorno, etc.) sino también las señales que alertan de las condiciones del medio interno y de las actividades de los sistemas del organismo (3, 4). Todas estas informaciones son integradas en el SNC para ofrecer las respuestas globales más óptimas para cada ser en concreto.

Dejando aparte las descripciones pioneras que desde la antigüedad se hicieron de algunas regiones y funciones del cerebro, dentro del SNC existen toda una serie de subsistemas sumamente complejos que se han ido definiendo por diferentes autores a lo largo del último siglo y medio. En una primera fase se intentaba sistematizar anatómicamente una región o subregión del cerebro a la que se atribuía una función concreta, tanto orgánica como mental o comportamental (funciones superiores del SNC). Más adelante, se focalizaron los estudios en los tipos neuronales (solamente en los últimos años se entra a considerar el papel de la neuroglía debido a la demostración de la constante cooperación funcional glío-neural (5-6)), sus conexiones y las vías nerviosas aferentes y eferentes que sustentaban dicha función (7). La biología celular y molecular, acaban tipificando subtipos morfofuncionales celulares y mostrando los mecanismos puestos en marcha para que la función cerebral tenga lugar (mensajeros externos e intracelulares, vías de señalización, receptores, etc. (8, 9)).

Se considera que el hipotálamo es una región cerebral especialmente implicada en el control del medio interno, de los sistemas endocrinos y los sistemas nerviosos simpático y parasimpático (10-18). Se definen en el hipotálamo varios “ejes” funcionales que controlan el medio interno y las funciones del organismo (10-18), siendo uno de ellos el “eje hipotálamo-(adeno)hipofisario-gonadal” (HHG o “HPG”-hypothalamic-pituitary-gonadal axis) el dedicado al control de la reproducción en su más amplio sentido, pero esencialmente en sus fases iniciales. Este eje está íntimamente relacionado con otros ejes orgánicos/vegetativos encargados de la regulación hormonal (como el eje hipotálamo-suprarrenal y el hipotálamo-tiroideo), del control energético, y de la regulación cardiovascular y de la temperatura, así como con los sistemas neurosecretores más clásicos (sistemas hipotálamo neurohipofisario, secretores de oxitocina y

vasopresina) que también participan en varias fases de la reproducción.

En el conocimiento de la función y la intervención terapéutica del eje HHG se considera crucial el descubrimiento de los nuevos péptidos neurosecretores.

El hipotálamo es una región del SNC que presenta unas características especiales frente al resto de las regiones, donde se van asentado ya una “formas” especiales de funcionamiento donde cada tipo de célula neuronal, neuroglial y vascular tienen características propias nuevas cada vez mejor definidas. En esta región del SNC se encuentran “núcleos grises”, anatómicamente muy mal definidos (**Figura 1**), que contienen muy distintos tipos de neuronas (**Figuras 2 y 3**): a) las clásicas neuronas de conexión sináptica que forman los circuitos nerviosos intrahipotalámicos y las eferencias extrahipotalámicas; b) neuronas “aminérgicas” que tienen una “neurotransmisión de volumen” (o difusa o extrasináptica), y no la clásica descrita a nivel del espacio intersináptico (19, 20), y que pueden actuar de interneuronas o como secretoras de aminas; c) neuronas esencialmente “neurosecretoras” (tanto las clásicamente conocidas, cuyos axones acaban en la neurohipófisis, como las que terminan en la eminencia media y en el órgano vasculoso de la *stria terminalis*).

En cuanto al sistema vascular, existe una muy rica vascularización de tipo convencional (con barrera hematoencefálica), y además existe un sistema “porta” vascular, estructura no muy habitual en los órganos de mamíferos, cuya misión es recoger las neurohormonas de acción adenohipofisaria en los capilares de la eminencia media y llevarlas a los capilares de la adenohipófisis (**Figura 4**). Las células endoteliales de las zonas “neurohemales” hipotalámicas (eminencia media, órgano vasculoso de la *stria terminalis*, capilares neurohipofisarios) y extrahipotalámicas en la región circunventricular (especialmente en la región pineal) tienen unas características especiales para la “filtración” de los péptidos (endotelio “fenestrado”, aposición de membranas).

También tienen una función especial las células endimarias de esta región hipotalámica que las implican de manera especial en sus funciones. Por último, se especula con la posibilidad de que exista una neurogénesis de importancia funcional en la reproducción a este nivel.

La reproducción en los mamíferos es una función no solo compleja sino que presenta variaciones notables en las diferentes especies. No puede considerarse una función linealmente desarrollado a lo largo de la evolución, sino que presenta características especiales en las distintas especies a lo largo del desarrollo evolutivo. Existen especies con “ovulación cíclica” con una gran independencia de factores externos medioambientales (roedores, primates –incluida la especie humana), mientras otras son especialmente dependientes de los ritmos circunuales y las condiciones medioambientales (rumiantes). La organización morfofuncional básica hipotalámica se especializa en cada especie biológica para cumplir la función en cada caso, haciendo difícil extrapolar los avances en el estudio de una especie a otras.

Por todo lo expuesto, complejidad del sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal; diversidad y mala definición morfofuncional de las áreas y núcleos, sus aferencias y sus eferencias; complejidad de tipos neuronales con diferentes expresiones de mensajeros y receptores; diversidad de células neurogliales, algunas muy características de la región hipotalámica; complejas interrelaciones neuronales (sinápticas y no sinápticas) y neurogliales; y recepción de estímulos sistémicos y ambientales, los avances en el control de la reproducción no solo abren nuevos caminos en el manejo reproductivo de las especies ganaderas y las especies en vías de extinción y la medicina reproductiva humana, sino que plantean muchos dilemas sobre la forma y manera de actuar farmacológicamente ya que se desconocen muchas de las conexiones celulares neuronales y gliales de cada especie, que utilizan muchas veces mecanismos de comunicación celular todavía no bien conocidos que pueden tener importantes consecuencias negativas sobre el entramado funcional nervioso y sistémico.

En esta pequeña revisión, se presentan algunos avances en el estudio del control cerebral de la reproducción y sus bases celulares y moleculares, señalando al mismo tiempo los puntos más conflictivos o desconocidos de los mecanismos subyacentes.

## 2. HIPOTÁLAMO, COMPLEJA Y MAL DEFINIDA REGIÓN DEL SNC, CON MULTIPLICIDAD DE FUNCIONES

EL hipotálamo es una pequeña región del SNC de características morfofuncionales muy heterogéneas, con células de muy diferentes subtipos y relaciones de muy diverso tipo y que cumple funciones muy diversas. Su composición neuronal y su citoarquitectura, sin embargo, parecen ser bastantes similares en todos los mamíferos (1, 11, 16). Resulta muy difícil delimitar el hipotálamo de otras regiones diencefálicas perihipotálamicas, así como de regiones telencefálicas anteriores y mesencefálicas posteriores. Puede considerarse “hipotálamo” toda la zona diencefálica situada debajo del Tálamo que forma las paredes y suelo del tercer ventrículo (1).

### 2.1. Áreas y núcleos hipotalámicos

Dentro del hipotálamo se han definido muchos “núcleos” o “áreas” por muchos autores a lo largo de más de sesenta años de estudio (entre 18 y 25 subdivisiones), pero no existe una sistemática comúnmente aceptada. En la figura 1 se referencian algunas de las agrupaciones consideradas con mayor frecuencia en las publicaciones científicas. Se han agrupado en “subregiones” topográficas, considerando que existe una subzona medial (dividida artificialmente en región anterior, medial (“tuber cinereum”) y posterior (-mamilar-), en sentido rostrocaudal; y en región periventricular (-de mayor densidad celular-) y región paraventricular (-de menor densidad celular-), en el sentido mediolateral), una subzona dorsal y una lateral (**Tabla 1 y Figura 1**) (1). En la zona media del hipotálamo, formando el suelo del ventrículo medio, se encuentra la “eminencia media”, zona de especiales

características que se describe con posterioridad (**Figuras 1 y 2**).

En todas estas agrupaciones (núcleos y áreas), se encuentran una gran variedad de neuronas y células gliales que se analizan a continuación, difíciles de tipificar mediante métodos histo- y electrofisiológicos, pero que pueden clasificarse en parte mediante técnicas citoquímicas y de biología molecular. En ello se basan fundamentalmente los avances de los últimos años.

### 2.2. Conexiones nerviosas y neurohormonales hipotalámicas

Las interconexiones nerviosas del hipotálamo son sumamente complejas (1, 16) y se superponen funcionalmente a diferentes sistemas para la recepción de señales internas y externas no nerviosas. Dentro del hipotálamo existen conexiones entre las neuronas de cada agrupación y entre neuronas de distintas agrupaciones. Las aferencias hipotalámicas nerviosas principales ponen en contacto a esta región con casi todo el resto del SNC para recibir informaciones de sus funciones, bien directamente (amígdala, corteza piriforme y sistema olfativo, hipocampo, núcleos mesencefálicos y troncoencefálicos, retina) o indirectamente (neocortex y tálamo). Los fascículos de axones principales son: a) el fascículo medial del cerebro anterior (“medial forebrain bundle”) que recorre todas las áreas anatómicas cerebrales basales desde la región prefrontal a la médula y discurre por la zona paraventricular y basal del hipotálamo con múltiples conexiones hacia sus núcleos; b) el fornix; c) los tractos corticohipotalámicos mediales; d) la *stria terminalis*; y e) los fascículos mamilares (importantes en circuitos de memoria) (1, 22-24). Las conexiones eferentes nerviosas, consideradas en su conjunto, ponen al hipotálamo en conexión con el resto del SNC, pero parecen más selectivas en sus relaciones con algunas regiones (1, 7, 12, 13), siendo muchas de ellas las que mediatizan la regulación vegetativa a través del simpático y parasimpático. En paralelo a las vías nerviosas, gran parte de las eferentes son neurosecretoras, de capital importancia en la regulación de la reproducción; llevadas a cabo en la neurohipófisis (especialmente por axones de neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular) y las secreciones en los complejos vasculares de la eminencia media realizadas por subtipos de neuronas de características especiales situadas, muchas veces en diversos núcleos (como las que secretan el “péptido liberados de gonadotropinas”, GnRH – *gonadotropin-releasing hormone*).

Toda esta compleja red de conexiones del hipotálamo, aferentes y eferentes, nerviosas y no nerviosas, son la base de la multiplicidad de funciones, aparte del control de la reproducción: regulación del metabolismo del agua, del apetito y de la ingesta, de las funciones metabólicas energéticas, de las funciones vegetativas, de los sistemas hormonales, de los ritmos circadianos y circanuales, del ciclo vigilia-sueño, de las reacciones inmunitarias. También participan en la regulación de las emociones y diversos comportamientos, así como en la regulación de

funciones cognoscitivas (1, 7, 9-19).

### 3. DIVERSIDAD DE LAS NEURONAS HIPOTALÁMICAS Y NEURONAS CLAVE EN EL CONTROL DE LA REPRODUCTIVIDAD

Se ha insistido en la diversidad de subtipos neuronales en los distintos núcleos hipotalámicos, subtipos que no solo son morfológicos sino funcionales.

Muchos autores, tal como se ha dicho, han subdividido las neuronas hipotalámicas en dos subtipos funcionales: neuronas implicadas en formar parte y regular circuitos no secretores y neuronas secretoras de péptidos (es decir aquellas cuyos axones acaban sobre los vasos, en la eminencia media y en el órgano vasculoso de la *stria terminalis* o en la neurohipófisis). Esta simplificación es solo útil para explicar la base de la compleja eferencia global hipotalámica pero resulta poco adecuada para describir en profundidad muchos de los mecanismos implicados en las funciones hipotalámicas.

Como ejemplos importantes en el control de la reproducción se puede señalar que muchas de las neuronas secretoras, aparte de su axón principal que finaliza sobre los vasos, presentan colaterales axónicos que se dirigen hacia estructuras del SNC para inervarlas (**Figura 3**). Se han descrito fibras y botones sinápticos oxitocinérgicos, vasopresinérgicos, GnRHérgicos, etc., así como sus receptores específicos en neuronas de centros circunventriculares (25), hipocampo y otras áreas del SNC (ver más adelante). Por otro lado, este concepto de “secretar” debe ser matizado en el caso de muchas de las interneuronas reguladoras ya que parece existir una “neurotransmisión de volumen” (es decir, liberación de neurotransmisiones al espacio extracelular para actuar sobre receptores no sinápticos (20, 21)). Este parece ser el caso de las neuronas dopaminérgicas que regulan la liberación de GnRH en la eminencia media y que podría ser extrapolable a otras interneuronas periventriculares.

Morfológicamente, empleando técnicas de impregnación metálica (Golgi, plata de Cajal) se muestra la existencia de distintos subtipos neuronales en cada núcleo o área, en base al tamaño (neuronas “magnocelulares” o “parvocelulares”), al número y tipo de dendritas y existencia de espinas en ellas, y a la longitud (desarrollo “intranuclear” o “extranuclear”) de los axones y sus arborizaciones colaterales (**Figura 3**). Estudios con trazadores del transporte proximodistal o retrógrado intraneuronal y estudios electrofisiológicos han mostrado muchas conexiones aferentes y eferentes a estas neuronas. Estudios sobre liberación de neurotransmisores *in situ* han mostrado la existencia de glutamato, GABA, acetilcolina y aminor. Sin embargo no completan nuestra visión de los posibles circuitos y muchas de las funciones neuronales, aunque con estas técnicas ha sido posible evidenciar muchas remodelaciones neuronales de dendritas y sus espinas y de las conexiones sinápticas. Como por ejemplo de estos cambios se pueden señalar las modificaciones en las sinapsis glutamatérgicas axodendríticas y asosomáticas en las células del núcleo supraóptico y de las sinapsis noradrenérgicas durante la lactación (26, 27), los cambios

sinápticos inducidos por la leptina en el núcleo arcuatus (28), los cambios sinápticos en varios núcleos en la regulación del balance energético (29) o los cambios en las neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas en diversas condiciones ambientales y cambios internos que hemos observado (resultados no publicados).

Se debe señalar que muchos autores, con independencia de la implicación directa de las neuronas de algunos núcleos en determinadas funciones hipotalámicas, la mayoría de ellas pueden ser englobadas en el complejo “sistema reticular”, considerado en su sentido más amplio que recibe aferencias de todos los núcleos más diferenciados del SNC, para “integrar” las informaciones y elaborar diversas respuestas específicas para centros determinados del SNC y de fuera del SNC. Estas respuestas pueden estar mediatizadas por diversos tipos de neuronas de transmisión sináptica o elaboradoras de hormonas tisulares o celulares (generalmente colaborando ambos tipos neuronales) (30, 31). El objetivo de estas respuestas integradas, es adaptar las funciones de todo el organismo para lograr respuestas globalizadas del individuo (ante dolor, emociones, cambios ambientales) o específicas de determinadas situaciones, como puede ser la reproducción donde los componentes anímicos y el comportamiento reproductor son aspectos a tener en cuenta.

Estas neuronas “reticulares” se inician en la región telencefálica anterior y continúan por la parte basal-anterior en la conexión telencefálica diencefálica, septum, banda diagonal de Broca, hipotálamo y mesencéfalo (31, 32). El mayor porcentaje tiene su desarrollo dendrítico perpendicular al eje rostro-caudal (como en el hipotálamo, **Figura 3**) y sus axones más largos recorren longitudinalmente por el fascículo medial del cerebro anterior (**Figura 3**), con proyecciones hacia núcleos superiores y del mismo nivel.

Muchos colaterales axónicos hipotalámicos pueden discurrir dentro de los límites del núcleo o área, lo que parece sustentar una regulación de otras neuronas del núcleo, y otras colaterales que parecen dirigirse a núcleos o áreas colindantes, lo que supone una interrelación entre neuronas de distintos núcleos (**Figura 3**).

De la misma manera que ocurre con los axones, en muchos núcleos o áreas las dendritas están circunscritas – dentro de los teóricos límites (p.e., en los núcleos supraópticos, supraquiasmáticos o mamilares) mientras que en otras se observan dendritas que se desarrollan en núcleos vecinos (de neuronas centrales o de zonas marginales), con dendritas que pueden recibir información de fibras que inervan núcleos vecinos (**Figura 3**).

Estas relaciones entre neuronas de diferentes núcleos y las posibilidades de recibir simultáneamente informaciones de axones que inervan núcleos vecinos por dendritas extra desarrolladas, fundamenta la estrecha relación entre las funciones hipotalámicas, aunque sean tan aparentemente diversas las funciones como el control de la reproducción y el de funciones cognoscitivas. Este hecho ha de tenerse muy en cuenta tanto en la experimentación, al interpretar resultados, como en el desarrollo de posibles tratamientos

farmacológicos o no farmacológicos (estimulación profunda).

Los subtipos neuronales secretores están siendo definidos mediante la identificación de los péptidos específicos que sintetizan y liberan. En paralelo, el estudio de la localización de las neuronas que los sintetizan, de los axones que los transportan y liberan y de las células que poseen los receptores específicos, nos informan de las “vías” utilizadas en el desarrollo de las funciones hipotalámicas. A este tipo de neuronas pertenecen las más importantes relacionadas con el control cerebral de la reproducción.

Las neuronas secretoras más antiguamente conocidas son las que vierten sus productos en la neurohipófisis (las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular) y que pudieran ser visualizadas y estudiadas con técnicas neurohistológicas especiales (tinción de Gomori). La oxitocina y la vasopresina que liberan a la sangre (1).

Más modernamente han sido descritos nuevos tipos al descubrirse nuevos péptidos hipotalámicos con efectos reguladores en la adenohipófisis y otros tejidos sistémicos. Especial interés se ha tenido en el estudio de las células relacionadas con la reproducción, el control energético y metabólico y con las respuestas hormonales mediatizadas por una hormona liberadora de corticotropina (CRH, *corticotropin-releasing hormone*). Estos tipos de neuronas secretoras desde que comienzan a describirse se muestran como poseedoras de unas características muy especiales, y cuanto más se profundiza en su investigación, más complejas se muestran en sus características, comportamiento y regulación. Muchas de las neuronas que segregan un determinado péptido parecen, en principio, estar agrupadas y localizadas en un núcleo o área, pero estudios posteriores muestran que pueden existir agrupaciones o neuronas solitarias en otros núcleos o áreas. Cuando se intenta correlacionar la morfología neurohistológica clásica con la inmunocitoquímica no se consigue una unidad de criterio ya que las células inmunocitoquímicamente teñidas presentan distintas morfologías no superponibles a las histológicas. En la mayoría de los núcleos o áreas hipotalámicas, coexisten diversos tipos de neuronas secretoras en íntima relación, algunas con capacidad de expresar más de un péptido hipotalámico. Junto a ellas, se evidencia la existencia de neuronas aminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas (interneuronas o neuronas de proyección exterior), pero también existen muchas neuronas que todavía no se pueden clasificar bien porque no se han evidenciado hasta ahora su posible neurotransmisor, bien porque todavía desconocemos que péptido puede secretar (porque no se han descubierto o porque no lo podemos detectar con nuestra tecnología actual. Muchos grupos secretores contienen un número muy reducido de neuronas: p.e., los recuentos de las neuronas que sintetizan la hormona liberadora de gonodotropinas (GnRH, *gonadotropin-releasing hormone neurons*) en diferentes especies de mamíferos ofrecen cifras de entre 300 y 1300 células, con diferencias en subespecies (33) en distintos núcleos y existencias de neuronas solitarias hace difícil su estudio

con los métodos habituales aunque sean muy sofisticados (liberación tisular de sustancias, expresión de mensajeros ARN, hibridación in situ, etc.). Además, algunas de estas células cambian de morfología y secreción en diferentes fases reproductoras o inducidas por situaciones medioambientales (34). En algunos centros muy profundamente estudiados se ha encontrado una diversificación muy acusada de neuronas secretoras entremezcladas con neuronas no secretoras. Se puede poner como ejemplo el núcleo paraventricular que puede ser considerado uno de los mejor definidos del hipotálamo. Contiene dos tipos histológicos principales de neuronas, “magnocelulares” y “parvocelulares” (de mayor o menor tamaño). Diversos autores han subdividido este núcleo en 6-8 subregiones (35-37) con diferentes tipos de neuronas no secretoras y secretoras. Las neuronas magnocelulares parecen producir oxitocina y vasopresina que se libera en la neurohipófisis mientras que las neuronas parvocelulares secretan muy diferentes péptidos o son de tipo no secretor (35). Estas últimas neuronas neurosecretoras envían sus axones principales hacia la eminencia media o la región vascular de la estría terminal para liberar los péptidos hipotalámicos que son de dos tipos, liberadoras de neuronas hipofisarias o inhibitoras de la liberación de estas hormonas por varios mecanismos hipotalámicos o adenohipofisarios (hormona del crecimiento somatostatina, tirotrófina, gonadotropina, etc.). Existen neuronas que sintetizan más de un péptido así como neuronas mainérgicas que liberan sus transmisores en la eminencia media para activar regulatoriamente en esa zona o sobre la adenohipófisis al difundir a la sangre (la dopamina actúa como inhibidora de la secreción de prolactina). Tanto las neuronas no secretoras como muchas secretoras de las presentan axones colaterales que se proyectan principalmente hacia el mesencéfalo y hacia otros núcleos hipotalámicos. En este núcleo paraventricular existen, por tanto, neuronas claves de prácticamente todas las funciones de control que tiene el hipotálamo (ingesta, regulación hormonal, control energético y metabólico, estrés, etc.) (38). En el control de la reproducción, varios péptidos son importantes de reseñar: péptidos liberadores de la prolactina, la hormona luteinizante y la hormona estimuladora de los folículos (38). Estos péptidos son liberados de diferente manera: a demanda, “es decir, en respuesta a situaciones que requieran una intervención del SNC (aquí podrían incluirse los cambios estacionales) o mecanismos de mantenimiento del organismo (que incluyen variaciones fisiológicas circadianas, circanales, gestacionales, etc.) para adaptarse a los ritmos y circunstancias de cada ser de cada especie.

También cabe mencionar dos hechos que han de ser investigados en profundidad para entender los mecanismos moleculares que están detrás de las funciones hipotalámicas. En primer lugar se han descubierto que, además de que existen neuronas específicas para la secreción de un determinado péptido, en determinadas circunstancias otras neuronas (no secretoras o secretoras) pueden producir ese péptido. Por ejemplo, en diferentes circunstancias, y no solo de estrés como se había descrito,

aumenta la producción del péptido liberador de corticotropina en un solo subtipo neuronal (neuronas CRH clásicas) sino que transitoriamente se pueden detectar mensajeros RNA de este péptido en otras neuronas de este y otro núcleo, incluidas neuronas neurotransmisoras glutamatérgicas y GABAérgicas. Ello puede ser indicio de que existan muchos subtipos o subclases de neuronas que sintetizan o pueden sintetizar CRH, que son heterogéneas en sus características y comportamiento, con regulaciones diversas extra e intrahipotalámicas. Romanov y cols, 2017, (38) considera la existencia de una “modalidad funcional” específica (o cuadro específico de una situación en un individuo de una especie) en cada caso más que una respuesta de neuronas concretas de un subtipo. También hay que considerar la posibilidad de que no solo existan diferentes ortólogos de un péptido funcional (como ocurre en el caso del péptido inhibidor, denominado GnIH, de las neuronas GnRH, que fabrican y liberan el péptido liberador de hormonas gonadotropas, sino diferentes transcritos de función diversa (39-42) y que tienen especial importancia en la modulación sexual, el desarrollo y el control reproductivo.

Finalmente señalar la importancia que tiene las características de la producción y su regulación de los receptores los distintos péptidos activadores e inhibidores en todos los tipos neuronales secretores y no secretores de todos los núcleos y áreas hipotalámicas, así como en los restantes núcleos del SNC y células receptoras extra-SNC. Muchos de los cambios fisiológicos y patológicos residen en las modificaciones de los receptores más que en la funcionalidad de las “vías” nerviosas y moleculares del hipotálamo (43-46). Este es un capítulo bastante desconocido en muchos casos. Sin embargo, sí se conocen bien algunos casos, como los cambios en los receptores de melatonina en la *pars tuberalis* (47-50). Esta región expresa una densidad muy alta de estos receptores por lo que es responsable del efecto de los cambios de la melatonina debidas al fotoperiodo y que repercuten en la función de los núcleos hipotalámicos relacionados, así como la de los tanicitos de la eminencia media (con la consiguiente regulación de señales que llegan desde el sistema porta a los núcleos hipotalámicos).

Las neuronas más importantes en la reproducción son:

### 3.1. Neuronas productoras del péptido liberador de gonadotropinas (GnRH, gonadotropin releasing hormone) (51-56)

Estas neuronas se encuentran repartidas por distintos núcleos hipotalámicos (arcuatus, paraventricular, periventricular, área preóptica) y también en estructuras “reticulares” extrahipotalámicas (septum, Banda Diagonal de Broca). Su origen embriológico se sitúa en la placa olfatoria, emigrando hacia el cerebro y “colonizando el cerebro basal anterior y el hipotálamo (51). Aparte de su proyección hacia la eminencia media donde liberan el péptido al sistema porta hipotálamo hipofisario (**Figura 4**), se han evidenciado proyecciones hacia otros núcleos hipotalámicos, al órgano vasculoso de la *stria terminalis* y a regiones extrahipotalámicas como la amígdala, el

hipocampo y el córtex piriforme. Ello indica que no solo controlan la reproducción sino que están implicadas en otras funciones de control del SNC. Los principales receptores para el péptido se encuentran en las células adenohipofisarias, pero también existen receptores en las gónadas (roedores y primates, incluida la especie humana), en la placenta y la glándula adrenal. Presentan un tipo de secreción pulsátil muy característico, adecuado al desarrollo del ser y el estado reproductivo (en la mujer preúber, los picos de secreción se producen cada 3-4 horas, mientras que en la mujer fértil acaecen cada 1 ó 2 minutos (52-56)). Tienen una regulación sumamente compleja con células específicas principales dedicadas a este fin pero también son subsidiarias de la función de otros sistemas reguladores hipotalámicos (estrés, ingesta, regulación energética y metabólica, control emocional, etc.) (43-45). También es importante el control llevado a cabo por las interneuronas (dopaminérgicas en especial) y por las células gliales y los tanicitos mediante protaglandinas y NO (50). El control se efectúa en dos lugares: a nivel somático, controlando esencialmente la síntesis del péptido, y a nivel de la liberación en la eminencia media (FIG. 4).

### 3.2. Células secretoras del péptido inhibidor de las células que sintetizan el péptido liberador de gonadotropinas (células GnIH, inhibidoras de células GnRH) (39-42, 45, 57, 58)

Se consideraba, desde los años setenta que el GnRH era el único péptido hipotalámico regulador de la síntesis y liberación de las gonadotropinas hipofisarias, pero en el año 2000 se descubrió un nuevo péptido inhibidor (GnIH- (39, 40)) con diferentes ortólogos en distintas especies. Este péptido en distintas especies es sintetizados y liberado por neuronas hipotalámicas, especialmente en el núcleo paraventricular en aves y en el área hipotalámica dosomedial en mamíferos (41) y cuyos axones pueden ir a la eminencia medial y/o a otros núcleos hipotalámicos, pero también por células gonadales de diferentes vertebrados. Receptores para este péptido se encuentran en células GnRH y otras hipotalámicas, así como en la adenohipófisis y gónadas. Los estudios han mostrado que existe una gran disparidad de localización de estas neuronas en los núcleos hipotalámicos de las diferentes especies de aves y mamíferos (roedores, rumiantes), con axones o no liberadores del péptido en la eminencia media. Las neuronas secretoras de GnIH también parecen estar reguladas de muy diferente manera. Especial atención se ha prestado a su implicación en la regulación de la producción de gonadotropinas en aves y mamíferos cuya reproducción depende del fotoperiodo. En estas especies, la expresión de la GnIH es dependiente de los niveles de melatonina. La melatonina es una hormona de producción nocturna que actúa sobre las células productoras de GnIH (que poseen alta concentración de receptores para melatonina) para inducir expresión y liberación del péptido inhibidor en codorniz y roedores, pero el efecto es contrario en hámster y oveja (57). Las células GnIH también están reguladas de diferentes maneras por el

estrés, aunque en la mayoría de las especies producen una disrupción de la reproducción (57). También es dependiente de las especies, los efectos directos del GnIH sobre las células adenohipofisarias. En la rata, por ejemplo no parece tener efecto directo pero sí en otras especies de distintos mamíferos (58). Esto supone que deben estudiarse en cada especie los efectos antes de pasar a la terapéutica.

Es muy interesante toda una serie de estudios llevados a cabo sobre la presencia de células y fibras GnRH y GnIH en hipocampo de roedores que ponen de manifiesto que estas células no solo participan en la regulación de la reproducción sino también en el control de funciones cerebrales (58). Por ello, las posibles manipulaciones terapéuticas con estos péptidos y los agonistas y antagonistas de sus receptores pueden tener efectos desconocidos en las diferentes especies. Así mismo, se ha demostrado como células gliales pueden también fabricar algunos de estos péptidos, como hacen algunos tipos de astrocitos en el hipocampo de la rata (58).

### 3.3. Células secretoras de Kisspeptina (55, 56, 59-62)

La kisspeptina es un péptido descubierto en 2001 que tiene la capacidad de regular la acción de las células productoras de GnRH. Las células que producen este péptido hipotalámico se sitúan en diversos núcleos o áreas hipotalámicas, con mayor o menor presencia en los mismos, según las especies. Se conoce bastante bien su topografía básica en muchas especies de roedores y rumiantes, pero menos en primates (humanos y no humanos) (59-61). De una manera general, se pueden describir dos agrupaciones generalmente más densas, en primer lugar la situada en el núcleo arcuato y en segundo lugar la localizada en el área preóptica. Sus proyecciones son muy extensas y alcanzan casi todos los núcleos y áreas hipotalámicas periventriculares y paraventriculares desde la zona más rostral hasta la caudal y núcleos reticulares anteriores (núcleo de la estría terminal) y posteriores (substancia gris periacueductal). También se encuentran fibras kisspeptina positivas en muchas regiones del SNC y receptores para el péptido, lo que parece indicar la amplitud de sus efectos reguladores en otras áreas además de la reproducción. Estas células coexpresan otros neuropéptidos: galamina, dinorfina y neurokinina B las neuronas del aricuatus y dopamina, galanina y metencefalina las de la región preóptica. Por todo ello se consideran dos sistemas de diferente funcionalidad reguladora y que no solo intervienen en el “eje” hipotálamo-adenohipofisario gonadal (que controla la reproducción sino que son elementos de otros “ejes” reguladores de otros “ejes” hipotalámicos (59-61).

En el caso concreto del control de la reproducción sus efectos parecen producirse sobre el soma y las dendritas de las células productoras de GnRH, aunque se encuentran fibras kisspeptina positivas y receptores para este péptido, en la parte lateral de la eminencia media (62). Los terminales de kisspeptina no llegan a ponerse en contacto con los vasos del sistema porta, por lo que parece que actúan sobre los terminales GnRH para estimular su

liberación (62) con variaciones según las especies. Sin embargo, como ya se ha dicho respecto a las células anteriores, parece que existen muy diferentes subtipos de estas células con diferente expresión de los neuropéptidos y aminos co-expresados, diferentes receptores para su control y diferentes agrupaciones y conexiones según las especies de mamíferos estudiados. El sistema de kisspeptina presenta diferencias según el sexo (mayor número de células en hombres) y la fase de desarrollo del individuo y su madurez sexual, las fases de los ciclos reproductivos y esto con características diferenciales y específicas para cada especie. Los dos sistemas de células kisspeptina parecen estar relacionadas activándose/regulándose puntualmente y sus efectos activadores directos sobre las células GnRH son variables. Esta variabilidad se debe por una parte a que las células son heterogéneas en transmisores y receptores, por lo que sus señales efectoras son diferentes, y las estimulaciones e inhibiciones a las que están sometidas son diversas en cada subtipo y por otro lado en que los puntos de acción (soma, dendritas y/o axones de las células GnRH hipotalámicas son variables dependiendo de las distintas neuronas secretoras del péptido kiss. Para otros autores este sistema (o dos subsistemas celulares productores de kisspéptido) tratarían de controlar la función conjunta de las distintas células GnRH, de secreción pulsátil y adaptadas a diferentes fases o momentos de la reproducción (ritmos estacionales, proestro, etc.).

## 4. EMINENCIA MEDIA Y OTROS SISTEMAS NEUROHEMALES

Además de los núcleos y áreas hipotalámicas se debe destacar que el hipotálamo presenta unas estructuras especiales neurohemales de comunicación con el resto del organismo y que son la base morfológica de la liberación de péptidos secretores y la recepción de mensajeros sistémicos. En general puede decirse que el SNC está aislado del resto del organismo por la “barrera hematoencefálica” salvo en dos sistemas especializados, la conexión en los espacios de Virchow-Robin a nivel de los vasos perforantes de la piamadre-aracnoides (63) y los órganos neurohemales de las estructuras circunventriculares de la que es parte integrante el hipotálamo (25). Una de estas estructuras es la **eminencia media** donde acaban los axones de muchas células “secretoras” hipotalámicas fundamentales en el control de la reproducción (neuronas GnRH y GnIH, además de neuronas dopaminérgicas y otras no bien tipificadas todavía) (FIG 6). La eminencia media se caracteriza por ser una región que cierra el espacio entre el fondo del ventrículo y la piamadre en la línea media, con muy pocas células, prácticamente solo gliales (astrocitos y células germinales) y prolongaciones de los tancitos que forman una empalizada entre la base endimaria del ventrículo y los vasos sanguíneos que discurren por encima de la piamadre y la superficie limitante con la piamadre. Entre estas prolongaciones de los tancitos se encuentran los axones de células GnRH, GnIH, células dopaminérgicas y otras células en contacto más o menos estrecho que si no

hacen sinapsis en sentido estricto se cohesionan funcionalmente ya que tienen receptores para las sustancias que liberan estos axones. Las características morfológicas de los vasos sanguíneos, inicio del sistema porta hipotálamo hipofisario es que tienen una envoltura glial funcionalmente permeable a los terminales axónicos de las células, que se ponen en contacto con la membrana basal (generalmente más gruesa que en vasos normales del SNC, **Figura 2**) y la existencia de células endoteliales “fenestradas” (adoseamientos de membranas “vascular” y “contravasculares” que permiten la permeación de los péptidos hipotalámicos y la trasvasación al SNC de moléculas sanguíneas (**Figura 2**). Estructura parecida se observa en el sistema neurohemal de la *stria terminalis*.

## 5. DIVERSIDAD DE CÉLULAS GLIALES: ASTROGLÍA Y TANICITOS

De gran importancia en el control de la reproducción tienen las células gliales de la región hipotalámica.

En primer lugar hay que reseñar que el papel de cooperación en la función neuronal neurotransmisora y no neurotransmisora que se ha descrito para la neuroglía en los últimos años (5-7) está presente en esta región del SNC en su máxima expresión. No solo se está demostrando que regula la neurotransmisión glutamatérgica sino que la astroglía es receptora de señales sistémicas que luego revierten en mecanismos de regulación neurotransmisora. La función reguladora de las conexiones sinápticas ejercida por la astro y microglía es relevante en muchas de las adaptaciones a situaciones de las fases de la reproducción y situaciones exógenas (alimentación, ritmos circadianos, circunstancias ambientales). La astroglía responde a niveles de glucocorticoides, metabolitos (glúcidos y lípidos) e iones y la microglía participa en la remodelación sináptica.

De especial importancia es la función que ejercen los tanicitos, células conservadas durante el desarrollo embrionario de la primitiva “glia radial” generadora del sistema nervioso adulto.

Los tanicitos pueden ser subclasificados en varios subtipos (FIG 6) según tengan sus prolongaciones con mayor o menor relación con la piamadre. Existen tanicitos que mandan prolongaciones hacia núcleos ventromediales (tanicitos  $\alpha$ ), tanicitos con prolongaciones hacia el núcleo arcuatus (tanicitos  $\beta$ ) y tanicitos con prolongaciones hacia la eminencia media que llegan hasta la piamadre. En una revisión reciente (64) se calificaba a estas células como “*masters and servants of metabolic, neurocrine and neurogenic functions*” del hipotálamo. Reciben informaciones de moléculas existentes en el líquido cefalorraquídeo (subsidiarias de las funciones del SNC), de vasos sanguíneos y del líquido intersticial hipotalámico así como de los vasos del sistema porta (los tanicitos de la eminencia media). Todas estas señales les hacen emitir otras señales eferentes (prostaglandinas, NO, etc.) hacia las neuronas ventromediales y del arcuatus que regulan las funciones de los axones de estas células y que son especialmente importantes en la liberación de los

neuropéptidos hacia el sistema porta hipotalámico-hipofisario. Estas células son especialmente sensibles a cambios en los sistemas neuroendocrinos relacionados con los ciclos estacionales (65) melatonina y otros factores alimentarios. Además estas células se están mostrando como generadoras de nuevos nichos de neurogénesis y neurogliogénesis de nuevas células neuronales y neurogliales que pueden ser de gran trascendencia en la regulación de la reproducción y que deben ser estudiadas en profundidad en todas las especies, incluida la humana (64, 65).

## 6. IMPLICACIONES DEL SISTEMA DE CONTROL CEREBRAL DE LA REPRODUCCIÓN EN LA FISIOLOGÍA, PATOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

El esquema básico que se ha presentado del control hipotalámico de la reproducción (**Figura 4**) parece estar asentado en todos los cordados a lo largo de la evolución, pero presenta unas características “específicas” en cada especie. Existe un control nervioso y otro hormonal sobre el organismo. El primero, mediatizado por los nervios simpáticos y parasimpáticos, el segundo por factores hormonales hipotalámicos que, en su mayor parte actúan sobre la adenohipófisis haciendo que ésta fabrique y segregue hormonas gonadotropas y otras que controlan los cambios en los órganos y sistemas reproductores, y en menor medida pueden actuar sobre algunas células de estos órganos. Para llevar a cabo este control existen neuronas específicas en los distintos núcleos o áreas hipotalámicas con neuronas “secretoras” y “no secretoras”, íntimamente relacionadas ya que interconexionan tanto neuronas “no secretoras” de comunicación sináptica clásica como las neuronas “secretoras” tanto de manera sináptica como no sináptica. Receptores para neurotransmisores clásicos como glutamato, GABA y aminas existen junto a receptores para neuropéptidos secretados al espacio interneuronal, pero, además, hay que tener en cuenta que muchos neurotransmisores de las interneuronas se liberan no sinápticamente sino de manera libre al espacio extracelular (“transmisión de volumen”) y que muchos péptidos se liberan “sinápticamente” en terminales colaterales de axones sobre otras neuronas. El sistema básico del control hormonal de la reproducción parece tener como punto clave inicial la célula de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, gonadotrophin-releasing hormone) que es antagonizada por la célula secretora GnIH (hormona inhibidora de la liberación de gonadotropinas) y activada/regulada por las células secretoras de kisspeptina. GnIH puede actuar sobre las células GnRH o las células hipofisarias pero parece que no la kisspeptina. Este esquema básico tiene características específicas en cada especie y es muy modulable. Se han encontrado diferencias muy significativas en las células y conexiones en las especies estudiadas (rata, ratón, hámster, cobaya, oveja, cabra, ciervo, primates no humanos, hombre) y, por otro lado varían mucho en la función (comportamiento celular, síntesis y liberación de neurotransmisores y péptidos, así como de los receptores para estas sustancias



efectoras como para sustancias reguladoras neuronales (de otros ejes o sistemas hipotalámicos y otras neuronas extrahipotalámicas), gliales (protaglandinas, NO, etc.), sistémicas (hormonas, glucosa, glucocorticoides, lípidos, etc.) y de otras neurohormonas extrahipotalámicas (en especial la melatonina epifisaria, otro centro principal de secreción del “sistema circunventricular” al que pertenece el hipotálamo (25). Existen muchas neuronas hipotalámicas “sensoras” de las condiciones del medio interno que facilitan posteriormente la información a las neuronas del eje hipotalámico-adenohipofisario-gonadal y que funcionan así mismo como control de retroalimentación positiva o negativa del conjunto GnRH-GnIH-Kispeptina.

El sistema de control gonadotrófico se modula en cada especie para adaptarse a situaciones específicas de cada individuo (desarrollo, edad, fase del ciclo reproductivo, circunstancias ambientales -con mayor o menor importancia en especies de diferentes fotoperíodos-, ritmos diarios o anuales, etc.) o circunstancias por la que atraviesa (alimentación, estrés, cambios patológicos del medio interno o de los órganos y sistemas). En este sentido, tal como propone Romanov y cols. (38), para la hormona controladora de corticotropinas, en cada momento o situación se debería hablar más de “situación funcional” del sistema en todas las neuronas que lo expresen o lo puedan expresar, que sobre modificaciones de las células que se consideran más importantes en la expresión de un péptido.

El esquema simplificado presenta ya “*per se*” una gran serie de dilemas por la indefinición de los núcleos y áreas hipotalámicas, de los grupos neuronales que los integran y la variabilidad de sus neuronas y conexiones. Esta variabilidad se ha puesto de manifiesto en los estudios neurohistológicos de sus dendritas y axones; en los estudios de la localización de receptores y de las respuestas bioquímicas/citoquímicas y electrofisiológicas. Las interconexiones con otras células tanto de neuronas clasificadas como elementos integrantes de otros “ejes” reguladores hipotalámicos (controladores del estrés, regulación energética-metabólica, ritmos circadianos-circanoales, vigilia-sueño, emotividad, etc.), o de control del SNC son muy variables y modificables. Así mismo, existen muchos otros tipos neuronales en núcleos o áreas hipotalámicas todavía no bien definidas en sus funciones que se interrelacionan específicamente con estas neuronas “secretoras” básicas reguladoras de la función reproductora, como son neuronas dopaminérgicas del núcleo arcuatus y neuronas que secretan neuropéptido Y, anexina, corticotropina, oxitocina y otras neuronas de núcleos preópticos, periventriculares y paraventriculares que cumplen dos funciones básicas, cooperadoras en la función y coordinación con otras funciones de control hipotalámico o de la función global cerebral. Por todo ello, cualquier intervención terapéutica tendente a controlar la función reproductiva de una especie, precisa un estudio en profundidad de esa especie pues no es posible extrapolar estudios llevados a cabo en otras especies, ni puede

generalizarse lo acaecido en esa especie en una situación a todas las fases reproductivas ni todas las situaciones endógenas o exógenas ni etapas del desarrollo. Además, las implicaciones que tienen las modificaciones de las neuronas responsables del control de la reproducción, no solo afectarán al comportamiento reproductivo global sino que afectarán a otros sistemas de control hipotalámico, incluidos los ejes reguladores de otros sistemas comportamentales reproductivos sino a sistemas controladores hormonales y nerviosos del organismo y sistemas cerebrales comportamentales y cognoscitivos.

## **7. CONCLUSIONES: AVANCES, DILEMAS Y FUTURAS INVESTIGACIONES SOBRE EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN POR EL SNC**

Desde hace muchos años se considera que el control de la reproducción radica en el cerebro y que el hipotálamo es la región central directamente implicada en esta función. Los avances de los últimos años confirman en este concepto, pero al estar esta región cerebral íntimamente conectada con el resto del SNC, de donde recibe una constante información por las interconexiones nerviosas, se ha puesto de manifiesto una más amplia dependencia de otras regiones cerebrales. Simultáneamente el hipotálamo recibe otras informaciones de la situación del medio interno mediante mediadores moleculares que activan “neuronas sensitivas” hipotalámicas especializadas, lo que indica una mayor dependencia del medio interno y el funcionamiento de otros órganos que lo anteriormente considerado. La integración de las señales nerviosas y de mensajeros sistémicos moleculares, tras ser debidamente procesadas por los diferentes núcleos y áreas hipotalámicas produce una respuesta modulada que, mediante “vías” nerviosas y neurohormonales, da lugar a respuestas globales reguladoras del organismo. Se han definido distintos “ejes” funcionales (hipotálamo adenohipofisarios o hipotálamo-neurohipofisarios) para definir las principales vías de acción regulatoria sobre el organismo (energía y metabolismo, medio líquido interno, control simpático y parasimpático, estrés) siendo una de las más estudiadas en la actualidad el eje “gonadal” que controla la reproducción. Pero las amplias interconexiones que cada vez se van poniendo más de manifiesto (entre los núcleos y neuronas no secretoras y secretoras del hipotálamo; entre éstas neuronas y las extrahipotalámicas; y entre los ejes funcionales descritos), hacen cada vez más difícil describir con exactitud la base morfofuncional de cada individuo de cada especie en cada situación (sexo, edad, estadio del ciclo reproductivo, condiciones externas y externas), máxime cuando existen enormes capacidades de adaptación de las células y los sistemas funcionales.

Las neuronas descritas en los últimos años relacionadas con la reproducción son las neuronas secretoras de GnRH, GnIH y Kisspeptina (neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropina, la productora de la hormona inhibidora de las neuronas GnRH y las neuronas reguladoras de GnRH mediante el péptido Kisspeptina), pero todavía se desconoce si existen otros péptidos reguladores de las gonadotropinas hipofisarias así como de

otras neuronas (o péptidos) que producen factores controladores de estas neuronas. Si se sabe que estas neuronas están formadas por subconjuntos que pueden secretar otras sustancias y/o ser reguladas de diferente manera.

La compleja interrelación de los subtipos morfofuncionales de las neuronas de los diferentes núcleos o áreas del hipotálamo plantea dudas sobre la actuación terapéutica. Sabemos, que la reproducción está muy ligada con el estrés, el control energético y alimentario, las condiciones ambientales (mandatorias en algunas especies de mamíferos) y la regulación visceral (simpática y parasimpática), hormonal y del medio interno, todas ellas de función reguladora hipotalámica, pero desconocemos las vinculaciones con otras “vías” de control cerebral (cognoscitivo y comportamental) así como de sus implicaciones en el control del envejecimiento e involución patológica, sistémica y cerebral y alteraciones en la producción de cáncer. Muchas de las conexiones neuronales de las neuronas no-secretoras y secretoras hipotalámicas (observables en estudios neurohistológicos y neurohistoquímicos) son todavía muy poco conocidas. Posibles tratamientos farmacológicos y no farmacológicos, estimulando “específicamente” algunos tipos neuronales pueden tener consecuencias adversas al desestimar conexiones colaterales a otros sistemas o desconocer la existencia de neuronas de un subtipo en otras “vías” o “ejes” funcionales del hipotálamo, con lo que se podrían inducir fenómenos secundarios de gran transcendencia. La gran variabilidad de las conexiones sinápticas y la secreción de neuropéptidos parece indicar que es necesario conocer la “modalidad funcional” específica (o cuadro específico de una situación en un individuo de una especie) más que las células intervinientes en un proceso antes de modificar la función de algún tipo celular. En el campo de la reproducción teóricamente podemos aumentar farmacológicamente el periodo reproductivo en todas las especies, pero ¿qué implicaciones tiene sobre las otras “vías”/“eje” de control hipotalámico?

Por otro lado, no se debe olvidar que aunque el hipotálamo es el regulador básico de la reproducción en mamíferos, no todas las especies tienen un control similar: hay especies dependientes de ritmos circunales y otras no. No se pueden extrapolar los resultados de las investigaciones en roedores, óvidos, bóvidos, primates no humanos y humanos. En muchos casos, las estructuras morfofuncionales (núcleos, neuronas no secretoras y secretoras) pueden ser las mismas, pero sus funciones específicas en cada especie pueden ser diferentes debido a su especialización en cada especie.

También hay que tener en cuenta todos los últimos resultados de las nuevas investigaciones sobre las células gliales (astrocitos, microglía y células epéndimo-radiales) ya que proporcionan reguladores para la función neuronal (prostaglandinas, NO, etc.) que pueden llegar a imponerse en la función liberadora de factores neuroendocrinos hipotalámicos. También de importancia capital, está la posibilidad de la neurogénesis en los espacios periventriculares que se está dando a conocer y que podría

ser una diana de terapia celular en los próximos años, cuando pueda ser totalmente conocida y controlada de manera segura.

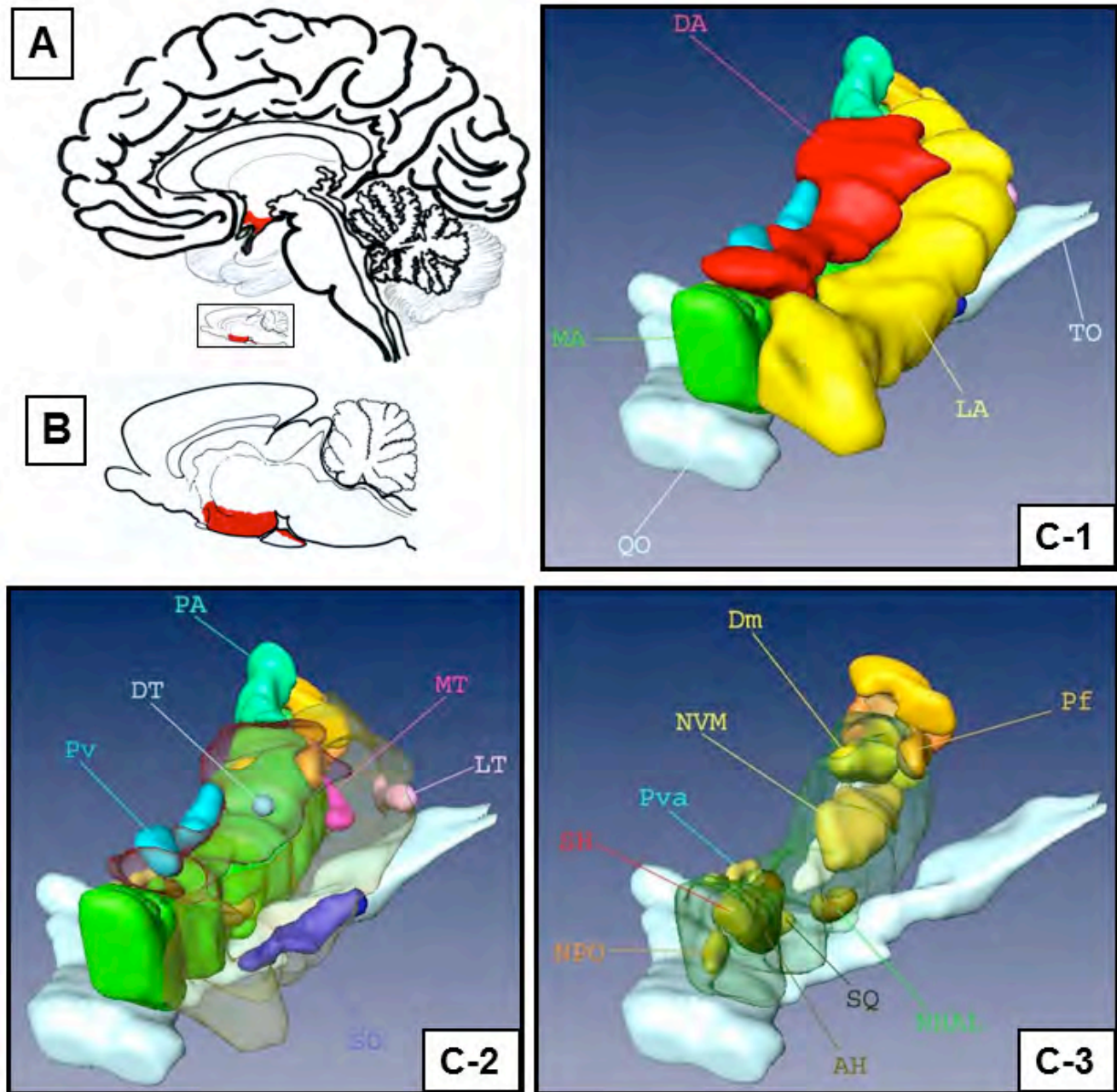
Se ha avanzado mucho en el conocimiento del control reproductivo del cerebro, pero se necesitan muchas más investigaciones para que se pueda intervenir de manera segura en las especies ganadera y en la reproducción humana.

## 8. REFERENCIAS

1. Toledano A. El hipotálamo, su complejidad morfofuncional y su capacidad para dirigir los sistemas reguladores del organismo. En: A. M. Pascual-Leone (ed.), *Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías*. Madrid: Real Academia de Farmacia 2005. Pp: 61-88
2. Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A. Nuevos conceptos sobre la funcionalidad del sistema nervioso: la revolución de las células gliales. I. Las relaciones neuro-gliales. *An Real Acad Farm* 2015; 81:11-8.
3. Selye H. The general adaptation syndrom and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrin.* 1946; 6:116-46.
4. Conti F. Claude Bernard: primer of the second biomedical revolution. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:703-8.
5. Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A, Merino JJ, Rodríguez-Arellano JJ. Brain local and regional neuroglial variations in Alzheimer's Disease. Cell types, responses and meanings. *Curr Alzheimer Res* 2016; 13:321-42.
6. Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A, Rodríguez-Arellano JJ. Nuevos conceptos sobre la funcionalidad del sistema nervioso: la revolución de las células gliales. II. Las respuestas neurogliales claves en la patogenia y el tratamiento de las enfermedades del SN. *An Real Acad Farm* 2016; 82:51-67.
7. Powley TL, Laughton W. Neural pathways involved in the hypothalamic integration of autonomic responses. *Diabetologia* 1981; 20 Supl: 378-87.
8. Kwon O, Kim KW, Kim MS. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73:1457-77.
9. Bagnol D. G protein-coupled receptors in hypothalamic circuits involved in metabolic diseases. *Curr. Opin. Drug Discov Develop* 2004; 7:665-82.
10. Fulton JF (coord.). *The hypothalamus and central levels of autonomic function*. Association for Research in Nervous and Mental Disorders. New York: 1940.
11. Morgane PJ. Historical and modern concepts of hypothalamic organization and function. En: *Handbook of the hypothalamus*. Vol. 1. Anatomy of the hypothalamus. JP Morgane y J Panksepp (eds.). New York, Basel: Marcel Dekker 1979; pp. 1-64.
12. Thompson RH, Swanson LW. Structural characterization of hypothalamic visceromotor pattern

- generator network. *Brain Res Rev* 2003; 41:153-202.
13. Benarroch EE. The central autonomic network: function, organization, dysfunction, and perspective. *Mayo Clin Proc* 1993; 68:998-1001.
  14. Ricardo JA. Hypothalamic pathways involved in metabolic regulatory functions, as identified by tracking methods. *Adv Metab Disord* 1983; 10:1-30.
  15. Toni R. Ancient views on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis: an historical and epistemological perspective. *Pituitary* 2000; 3:83-95.
  16. Toni R, Malaguti A, Benfenati F, Martini L. The human hypothalamus: a morpho-functional perspective. *J Endocrinol Invest* 2004; 27 (Supl 6): 73-94.
  17. Gainotti G. Disorders of emotional behaviour. *J Neurol* 2001; 248:743-9.
  18. Joels M, Verkuyl JM, Van Riel E. Hippocampal and hypothalamic function after chronic stress. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1007:367-78.
  19. Bennett MR, Hacker PM. Emotion and cortical-subcortical function: conceptual developments. *Prog Neurobiol* 2005; 75:29-52.
  20. Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A. Diversity and variability of the nicotine effects on different brain cortical regions. Therapeutic and toxicologic implications. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 2010; 10:180-206.
  21. Toledano A, Alvarez MI, Toledano-Díaz A. Multiple neuronal and glial mechanisms can be involved in the response to the activation of nicotinic receptors. In: A Costa, E Villalba (Eds), *Horizons in Neuroscience Research. Volume 3 Neural Transmissions: Characteristics, Mechanisms and Malfunctioning*. New York: Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge 2011; pp. 1-34.
  22. Záborszky L, Palkovits M. Ascending brain stem pathways to the diencephalon and limbic regions: a light and electron microscopic study in the rat. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 1978; 26:49-71.
  23. Palkovits M, Van Cuc H. Quantitative light and electron microscopic studies on the lateral hypothalamus in rat. Cell and synaptic densities. *Brain Res Bull* 1980; 5:643-7.
  24. Van Cuc H, Léránth C, Palkovits M. Light and electron microscopic studies on the medial forebrain bundle in the rat. I. Nerve terminals in the lateral hypothalamus of extrahypothalamic origin. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 1979; 27:59-68.
  25. Kaur C, Ling EA. The circumventricular organs. *Histol Histopathol* 2017 Feb 8;11881. doi: 10.14670/HH-11-881.
  26. El Majdoubi M, Poulain DA, Theodosios DT. Lactation-induced plasticity in the supraoptic nucleus augments axodendritic and axosomatic GABAergic and glutamatergic synapses: an ultrastructural analysis using the disector method. *Neuroscience* 1997; 80:1137-47.
  27. Michaloudi HC, el Majdoubi M, Poulain DA, Papadopoulos GC, Theodosios DT. The noradrenergic innervation of identified hypothalamic magnocellular somata and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. *J Neuroendocrinol* 1997; 9:17-23.
  28. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 2004; 304:110-5.
  29. Horvath TL. Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14 Suppl 5:228S-233S.
  30. Agnati LF, Guidolin D, Guescini M, Battistin L, Stocchi V, De Caro R, Genedani S, Fuxe K. Aspects on the integrative actions of the brain from neural networks to "brain-body medicine". *J Recept Signal Transduct Res* 2012; 32:163-80.
  31. Berlucchi G. Integration of brain activities: the roles of the diffusely projecting brainstem systems and the corpus callosum. *Brain Res Bull* 1999; 50:389-90.
  32. Haas HL, Lin JS. Waking with the hypothalamus. *Pflugers Arch* 2012; 463:31-42
  33. Kaugars KE, Rivers CI, Saha MS, Heideman PD. Genetic variation in total number and locations of GnRH neurons identified using in situ hybridization in a wild-source population. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2016; 325:106-15.
  34. Li S, Takumi K, Iijima N, Ozawa H. The increase in the number of spines on the gonadotropin-releasing hormone neuron across pubertal development in rats. *Cell Tissue Res* 2016; 364:405-14.
  35. Swanson LW, Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 1980; 194:555-70.
  36. Swanson LW, Sawchenko PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 1980; 31:410-7.
  37. Krashes MJ, Shah BP, Madara JC, Olson DP, Strohlic DE, Garfield AS, Vong L, Pei H, Watabe-Uchida M, Uchida N, Liberles SD, Lowell BB. An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature* 2014; 507:238-42.
  38. Romanov RA, Alpár A, Hökfelt T, Harkany T. Molecular diversity of corticotropin-releasing hormone mRNA-containing neurons in the hypothalamus. *J Endocrinol* 2017; 232:161-72.
  39. Osugi T, Ubuka T, Tsutsui K. Review: evolution of GnIH and related peptides structure and function in the chordates. *Front Neurosci* 2014; 8:255. doi: 10.3389/fnins.2014.00255.
  40. Poling MC, Kauffman AS. Regulation and function of RFRP-3 (GnIH) neurons during postnatal development. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015;

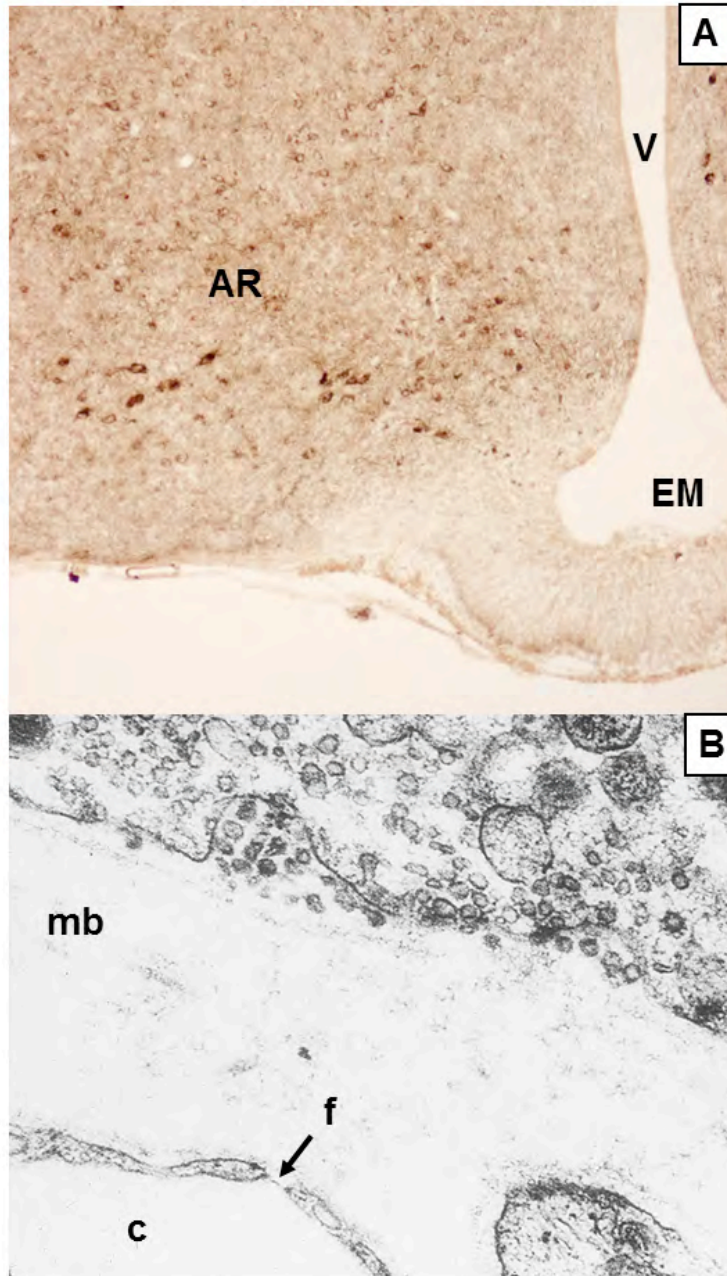
- 6:150. doi: 10.3389/fendo.2015.00150.
41. Ubuka T, Son YL, Bentley GE, Millar RP, Tsutsui K. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 190:10-7. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.02.030.
  42. Parhar I, Ogawa S, Kitahashi T. RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Prog Neurobiol* 2012; 98:176-96.
  43. Swaab DF, Hofman MA, Lucassen PJ, Purba JS, Raadsheer FC, Van de Nes JA. Functional neuroanatomy and neuropathology of the human hypothalamus. *Anat Embryol (Berl)* 1993; 187:317-30.
  44. Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 2005; 4:141-94.
  45. Clarke IJ, Bartolini D, Conductier G, Henry BA. Stress Increases Gonadotropin Inhibitory Hormone Cell Activity and Input to GnRH Cells in Ewes. *Endocrinology* 2016; 157:4339-50.
  46. Chun SK, Jo YH. Loss of leptin receptors on hypothalamic POMC neurons alters synaptic inhibition. *J Neurophysiol* 2010; 104:2321-28.
  47. Dupré SM. Encoding and decoding photoperiod in the mammalian pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 2011; 94:101-12.
  48. Barrett P, Bolborea M. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *J Pineal Res* 2012; 52:376-88.
  49. Wood S, Loudon A. Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *J Endocrinol* 2014; 222:R39-R49.
  50. Lewis JE, Ebling FJ. Tanycytes as regulators of seasonal cycles in neuroendocrine function. *Front Neurol* 2017; 8:79. doi:10.3389/fneur.2017.00079.
  51. Casoni F, Malone SA, Belle M, Luzzati F, Collier F, Allet C, Hrabovszky E, Rasika S, Prevot V, Chédotal A, Giacobini P. Development of the neurons controlling fertility in humans: new insights from 3D imaging and transparent fetal brains. *Development* 2016; 14:3969-81.
  52. Marshall JC, Griffin ML. The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod* 1993; 8 Suppl 2:57-61.
  53. Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Griffin ML, Kelch RP. GnRH pulse: the regulators of human reproduction. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1993; 104:31-46.
  54. Tsutsumi R, Webster NJ. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocr* 2009; 156:729-37.
  55. Chan YM. Effects of kisspeptin on hormone secretion in humans. *Adv Exp Med Biol* 2013; 784:89-112.
  56. Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update* 2014; 20:485-500.
  57. Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. Review: regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals. *Front Neurosci* 2013; 7:60. doi: 10.3389/fnins.2013.00060.
  58. Ferris JK, Tse MT, Hamson DK, Taves MD, Ma C, McGuire N, Arckens L, Bentley GE, Galea LA, Floresco SB, Soma KK. Neuronal gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and astrocytic gonadotrophin inhibitory hormone (GnIH) Immunoreactivity in the Adult Rat Hippocampus. *J Neuroendocrinol* 2015; 27:772-86.
  59. Yeo SH, Herbison AE. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology* 2011; 152:2387-99.
  60. Yeo SH. Neuronal circuits in the hypothalamus controlling gonadotrophin-releasing hormone release: the neuroanatomical projections of kisspeptin neurons. *Exp Physiol* 2013; 98:1544-9.
  61. Porteous R, Petersen SL, Yeo SH, Bhattarai JP, Ciofi P, de Tassigny XD, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Kisspeptin neurons co-express met-enkephalin and galanin in the rostral periventricular region of the female mouse hypothalamus. *J Comp Neurol* 2011; 519:3456-69.
  62. Lehman MN, Hileman SM, Goodman RL. Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects. *Adv Exp Med Biol* 2013; 784:27-62.
  63. Carmona P, Toledano A. Blood-based biomarkers of Alzheimer's Disease: diagnostic algorithms and new technologies". *Cur Alzheimer Res* 2016;13:450-64.
  64. Goodman T, Hajihosseini MK. Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Front Neurosci* 2015; 9:387. doi: 10.3389/fnins.2015.00387.
  65. Lewis JE, Ebling FJ. Tanycytes As Regulators of Seasonal Cycles in Neuroendocrine Function. *Front Neurol* 2017; 8:79. doi:10.3389/fneur.2017.00079.



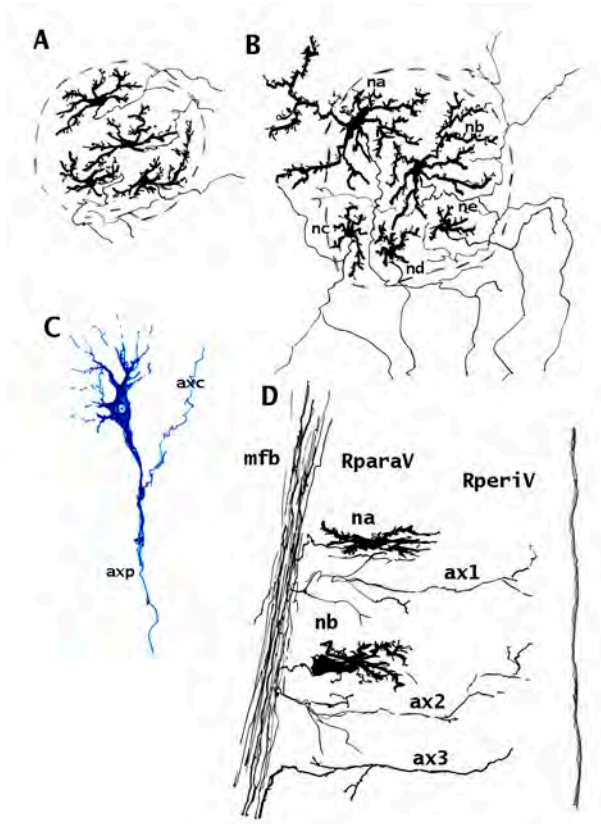
**Figura 1. Esquemas sobre el hipotálamo del hombre y de la rata.** Anatómicamente, la estructura, componentes y conexiones del hipotálamo son muy similares en todos los mamíferos. En A) se representa la proyección medial del hipotálamo (en rojo) en el cerebro humano y en el de la rata, observándose que su localización y volumen son similares. En B) se representa la proyección hipotalámica de la rata a mayor tamaño. En C) se muestran tres imágenes tridimensionales donde se posicionan las principales zonas, núcleos y áreas hipotalámicas. La estructura representada ha sido realizada mediante el programa de software AMIRA 3D (LGS International) empleando imágenes fotográficas de una serie completa de cortes de 25 micras teñidas con H/E del hipotálamo de una rata, En C-1), C-2) y C-3) la perspectiva es anterolateral. Se ha representado el hipotálamo izquierdo posicionado sobre la vía óptica, desde el quiasma (QO) al tracto óptico posterior (TO), como referencia. En C-1) se muestran las zonas topográficas hipotalámicas medial (MA), lateral (LA) y dorsal (DA) que se mencionan en el texto. En C-2), a través de la transparencia de la zona lateral y dorsal se observan los núcleos más importantes de estas zonas y en C-3), se representan sólo los núcleos del hipotálamo medial (incluyendo núcleos peri- y para- ventriculares). Las siglas corresponden a las mencionadas en la tabla I. (Esquemas modificado de referencia bibliográfica 1).



AR = n. arcuato (o infundibular); DA = zona hipotalámica dorsal; Dn = n. hipotalámico dorsomedial; DT = n. hipotalámico dorsal; LA = zona hipotalámica lateral; LT = n. hipotalámico lateral; MA = zona hipotalámica medial; NHAL = n. hipotalámico lateroanterior; NT = n. hipotalámico medial; NVM = n. hipotalámico ventromedial. PA = n. hipotalámico posteroanterior; Pv = n. paraventricular; Pva = n. paraventricular posterior; Qo = quiasma óptico; SM = n. premamilares; SO = n. Supraóptico; SQ = n. supraóptico; Pf = n. (o área) perifornical; TO = tracto óptico.



**Figura 2. Imágenes citológicas del hipotálamo de rata.** A). Sección transversal a nivel del núcleo arcuato mostrando las fibras gliales radiales de los tanicitos de la eminencia media (EM) y la variedad de tamaños y reactividad acetilcolinesterasa de las neuronas de este núcleo. B). Terminal de axón de neurona del núcleo paraventricular sobre capilar de endotelio fenestrado (f). Se observan gránulos de neurosecreción y la exocitosis del contenido de estos granos, a modo de esférulas (hormona oxitocina), pasando hacia la membrana basal del capilar (mb) (80.000x).

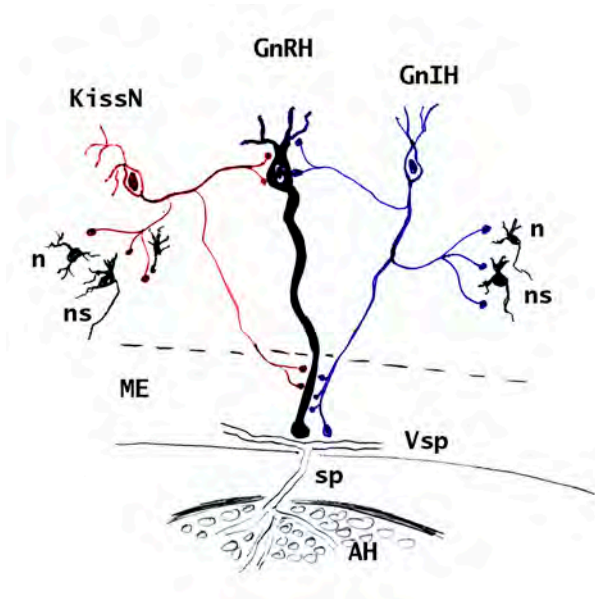


**Figura 3. Neuronas hipotalámicas.** A) Neuronas del núcleo supraquiasmático de rata. Sus dendritas están circunscritas dentro de los límites del núcleo y los axones salen en diversas direcciones a núcleos contiguos y lejanos. B) Neuronas del núcleo paraventricular de oveja. Se muestran dos neuronas “magnocelulares” (na, nb) y tres parvocelulares (nc, nd, ne). El axón de na, tiene pocas colaterales y sale al exterior, mientras que el de la nb, tiene muchas colaterales dentro del núcleo. Las dendritas de na se desarrollan ampliamente en los núcleos vecinos. C) Neuronas GnRH con un largo axón principal dirigido a la eminencia media (axp) y uno colateral ascendente (axc). D) Fascículo cerebral medial del cerebro anterior (medial forebrain bundle; mbf) de la oveja. Se observan fibras colaterales hacia núcleos de la región paraventricular (RparaV) y la región periventricular (RperiV) (axones ax1 y ax2). Se dibuja un axón proveniente de una neurona perivascular (ax3) que se integra en el mbf. Se observa que las neuronas hipotalámicas desarrollan sus complejos dendríticos en un plano normal al eje del ventrículo medio (v), tal como lo hacen las neuronas reticulares extrahipotalámicas.

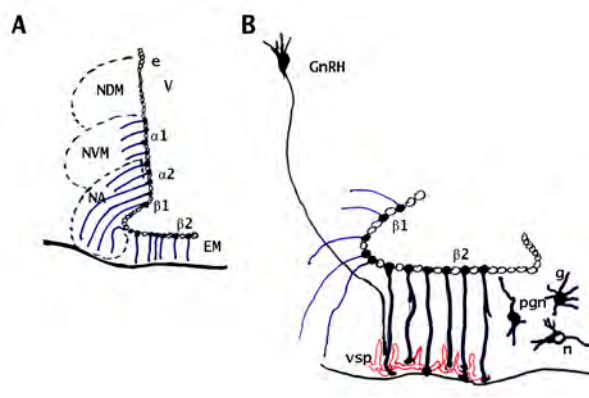
A), B) y C) Secciones transversales; D) Sección dorsobasal

A), B) y D) Dibujos con cámara clara de impregnación mediante el método de Golgi. C) Dibujo con cámara clara de una neurona del núcleo arcuatus de la oveja inmunoteñida con anticuerpos anti-GnRH.





**Figura 4. Esquema básico de las principales neuronas neurosecretoras implicadas en el control de la reproducción.** La neurona secretora de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH; gonadotrophin-releasing hormone) envía su axón hasta la eminencia media (EM) donde su terminal libera el péptido sobre los capilares del sistema porta (vsp). Estos capilares se recogen en la vena porta (sp) que se abre en capilares en la adenohipófisis (AH). Las principales neuronas reguladoras son: 1) la neurona productora del péptido inhibidor de GnRH (el péptido GnIH) que se libera generalmente en terminales en la eminencia media que se adosan a los de GnRH, aunque también pueden hacerlo sobre el soma y las dendritas de esas neuronas, dependiendo de las especies; y 2) las neuronas secretoras del péptido Kiss que activan las neuronas GnRH en su soma y dendritas, aunque en algunas especies también pueden activar los axones de GnRH en la eminencia media. Colaterales de los tres tipos de células pueden enviar colaterales axónicos hacia neuronas hipotalámicas secretoras y no secretoras y a neuronas extrahipotalámicas.



**Figura 5. Esquema sobre los tanicitos.** En A) se esquematizan los tipos y la localización topográfica ( $\alpha 1$  y  $2$ ) ( $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) en el núcleo dorsomedial (NDM), el núcleo ventromedial (NVM), el núcleo arcuatus (NA) y la eminencia media (EM). En B) se esquematiza la relación con los vasos iniciales del sistema porta (vsp), la membrana subpial y los axones terminales de las neuronas GnRH. También se ejemplifica la posible neurogénesis al considerar como algunos tanicitos pueden perder su prolongación, separarse de la línea endimaria y formar progenitores neurogliales que darán lugar a neuroblastos-neuronas (n) o glioblastos-células gliales (g).

**Tabla 1. Principales áreas y núcleos hipotalámicos existentes en las zonas topográficas en que se subdivide el hipotálamo.** En azul se indican los núcleos y áreas más relacionadas con el control de la reproducción. Las siglas que figuran entre paréntesis ayudan a identificar los núcleos en las reconstrucciones de la figura 1. A = área; N = núcleo.

<b>H. MEDIAL (MA)</b>		
<b>Paraventricular</b>		<b>Periventricular</b>
A. preóptica medial N. preóptico medial (NPO) N. septohipotalámico (SH) A. hipotalámica anterior N. hipotalámico anterior (NHA) N. hipotalámico anterior lateral (NHAL) N. hipotalámico anterior caudal	ANTERIOR	N. periventricular preóptico Lamina terminalis N. periventricular anterior N. Supraquiasmático (SQ) N. periventricular paraventricular (Pva)
A. tuber cinereum (TC)  N. hipotalámico ventromedial (NVM)  N. Perifornical (Pf)	MEDIAL TUBER CINEREUM	N. arcuato (AR) o infundibular  N. hipotalámico dorsomedial (Dm)  N. tuberal magno celular (MT)
A. hipotalámica posterior N. Submamilotalámico N. premamilar dorsal N. premamilar ventral (PmV) N. mamilar medial (MM) N. mamilar lateral N. supramamilar (SM) N. causal magno celular (CM)	POSTERIOR MAMILAR	N. arcuato (AR) o infundibular
<b>DORSAL</b>		<b>LATERAL</b>
A. hipotalámica dorsal N. del techo de la estría terminalis N. Paraventricular (PV) N. Dorsal Tuberal N. dorsal N. parvo celular		A. lateral preóptica A. lateral hipotalámica N. Supraóptico (SO) N. Tuberal lateral (LT) N. Tuberal medial (MT)
<b>OTROS DERIVADOS DIENCEFÁLICOS LINDANTES CON EL HIPOTÁLAMO</b>		
N. del lecho de la estría terminalis (ST) N. Banda diagonal de Broca (BDB) Globos Pallidus (GP) Núcleo entopeduncular (En) A. zona incerta (ZI) Núcleo de Forel (FF) Núcleo de Luys (SL) Núcleos Subtalámicos (subT)		



# Predicting anti-*Trypanosoma brucei rhodesiense* activity of a group of Dicationic 3,5-diphenylisoxazols by Molecular Topology

**Title in Spanish:** *Predicción de la actividad anti-Trypanosoma brucei rhodesiense de un grupo de 3,5-Difenilisoxazoles dicationicos por medio de la Topología Molecular*

Karla Vasco-Aguas<sup>1</sup>, Elena Barrio-Miguel<sup>1</sup>, Carmen Ferrando-Hernández<sup>1</sup>, María Álvarez-Izquierdo<sup>1</sup>, Jorge Gálvez<sup>2</sup>, Ramón García-Domenech<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia. Avd. V.A Estellés. s/n, 46100-Burjassot. Valencia, España. <sup>2</sup>Departamento de Química Física, Facultad de Farmacia. Universitat de Valencia. Avd. V.A Estellés. s/n, 46100-Burjassot. Valencia, España.

**ABSTRACT:** Currently, there are more than 65 million people at risk of contracting sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei*. Available treatments for this parasitic disease are limited and have side effects. There is a necessity to investigate novel, effective compounds that also yield low in toxicity. Quantitative Structure-Activity Relationship models (QSAR) have been used in this study for predicting anti-*Trypanosoma brucei* activity and potency in a group of dicationic 3,5-Diphenylisoxazoles. Linear Discriminant Analysis (LDA) correctly classified anti-*Trypanosoma brucei* activity in 100 % of cases (sensitivity) and inactivity in 86.7 % (specificity). Theoretical bioactivity (pIC<sub>50</sub>) of the studied compounds was predicted using Multilinear Regression Analysis (MLRA), demonstrating a high correlation between *in vitro* and *in silico* results ( $r^2=0.82$ ). Topologic models obtained with LDA and MLRA were applied to the screening of a group of dicationic analogs which presented a high *in silico* activity. These compounds when selected for *in vitro* analysis could reduce both time and costs in future drug research.

**RESUMEN:** Actualmente más de 65 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad del sueño producida por *Trypanosoma brucei*. Los tratamientos actuales para esta parasitosis son limitados y poseen efectos colaterales, por lo que es necesario buscar nuevos compuestos activos que sean potentes y de baja toxicidad. En este estudio se utilizaron los métodos de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) para predecir potencia y actividad anti-*Trypanosoma brucei rhodesiense* de un grupo de 3,5-Difenilisoxazoles Dicationicos. Mediante el Análisis Lineal Discriminante (ALD) se clasificó correctamente la actividad anti-*Trypanosoma brucei* en el 100 % de los casos (sensibilidad) y la inactividad en el 86,7 % (especificidad). Adicionalmente, a través del análisis de regresión multilíneal (MLRA) se predijo la bioactividad teórica (pIC<sub>50</sub>) de los compuestos estudiados, mostrando una elevada correlación de los resultados obtenidos *in vitro* e *in silico* ( $r^2=0,82$ ). Finalmente, los modelos topológicos obtenidos en el ALD y MLRA fueron aplicados a un grupo de análogos dicationicos para cribado molecular que presentaron una teórica elevada actividad y podrían ser seleccionados para su futuro análisis *in vitro* ahorrando tiempo y costes en la búsqueda de futuros tratamientos.

\*Corresponding Author: ramon.garcia@uv.es

Received: April 12, 2017 Accepted: May 7, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 2 (2017), pp. 241-250

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis africana humana (TAH) o enfermedad del sueño, es una parasitosis producida por *Trypanosoma brucei* (*T. brucei gambiense* en el 98 % de los casos notificados y *T. brucei rhodesiense* en el porcentaje restante (1). Este protozoario es transmitido por las moscas del género *Glossina*, comúnmente denominadas moscas tse-tse, que se encuentran distribuidas en el continente africano (2-4). Treinta y seis países subsaharianos son considerados endémicos de una u otra forma de la enfermedad (3). En el 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 3796

casos de la enfermedad y se estima que existen aproximadamente 65 millones de personas en riesgo (1).

Esta parasitosis tiene dos fases: la aguda donde el parásito se desarrolla en sangre y linfa, y la crónica en la que atraviesa la barrera hematoencefálica e invade el sistema nervioso central pudiendo causar la muerte (1).

A día de hoy, se cree posible llegar a la eliminación de la enfermedad del sueño debido a la disminución de un 73,4 % de los casos en el periodo que va desde 2001 a 2010 (2,4). Actualmente, el protocolo seguido para el tratamiento de la THA consiste en la administración de pentamidina o suramina en la primera etapa de la

enfermedad y de melarsoprol o eflornitina en la segunda (1). Todos ellos, especialmente los dos últimos, producen efectos colaterales no deseables que llevan a la búsqueda de nuevos principios activos contra *Trypanosoma brucei* (1). El tratamiento ideal debe ser de administración oral, efectivo frente a las dos formas de la enfermedad, de bajo costo para la población y de aplicación en ausencia de personal cualificado (2,3).

En los últimos años, varios candidatos a fármacos para el tratamiento de la THA han sido estudiados en fases clínicas. Uno de estos compuestos es el maleato de furamidina (pafuramidina), profármaco de la furamidina (análogo y alternativo a la pentamidina) (5,6). La pafuramidina es mucho menos activa *in vitro* que la furamidina pero resulta activa por administración oral. Debido a los buenos resultados obtenidos, este profármaco llegó a fase clínica III pero fue abandonado por producir hepatotoxicidad e insuficiencia renal (7).

La presente investigación se centra en el estudio de los análogos del 3,5-difenilisoaxazol, activos *in vitro* contra la TAH, donde el anillo central de la furamidina es sustituido por un isoaxazol (8). El 3,5-Bis(4-amidinofenil)isoaxazol es el compuesto principal de la serie ( $n^{\circ}$  3 en Tabla 1) y el más parecido estructuralmente a la furamidina. Otras tres diamidinas ( $n^{\circ}$  13,  $n^{\circ}$  22 y  $n^{\circ}$  32 en Tabla 1) son regioisómeros de  $n^{\circ}$  3 y presentan diferente orientación de los grupos amidina, lo cual se ha comprobado que es definitivo para la actividad anti-*Trypanosoma* (8).

La selección de moléculas potentes y activas frente a la TAH puede simplificarse a través de la aplicación de la topología molecular (TM), que se basa en la generación de modelos matemáticos mediante estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) (9,10). Dicho de otra forma, los estudios QSAR se basan en la suposición de que la estructura de la molécula define sus propiedades. Este método simboliza al compuesto como un grafo de hidrógenos suprimidos, definido por un conjunto de vértices (átomos) y aristas (enlaces) (11), que posteriormente es representado como una matriz que servirá para el cálculo de índices topológicos (IT). Los IT

empleados con mayor frecuencia son: el índice de Wiener, el índice de conectividad de Randic, y los índices de carga (11,12). El cálculo de estos IT tiene como principal ventaja, que sus valores son independientes de la conformación de la molécula en un determinado momento (13). A partir de los IT obtenidos, se realiza un análisis de regresión multilínea y un análisis lineal discriminante para obtener el nivel de bioactividad y una función discriminante capaz de clasificar una molécula dada como “buena” (activa) o “mala” (inactiva) respecto a cierta propiedad farmacológica. Una vez que se obtiene la ecuación matemática basada en estos IT para la predicción de una determinada propiedad, se lleva a cabo un cribado virtual o screening para rastrear e identificar nuevos compuestos activos (10). De hecho, la topología molecular se ha empleado en varios estudios relacionados con la identificación de nuevos compuestos anti *T. brucei* (13,14), anti-protozoáricos (15,16), anti-maláricos (17) y anti-microbianos (18).

Este estudio tiene como objetivo la predicción de la actividad anti-*Trypanosoma brucei rhodesiense* de un grupo de 3,5-Difenilisoaxazoles dicationicos previamente testados *in vitro* por medio de los métodos QSAR utilizando el análisis lineal discriminante y el análisis de regresión multilínea. Por otro lado, se aplicó el modelo QSAR para testear un grupo de moléculas diseñadas *in silico* para seleccionar aquellos compuestos con alta bioactividad teórica.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Compuestos analizados

Se analizó un grupo de entrenamiento compuesto por 43 moléculas análogas del 3,5-difenilisoaxazol (Tabla 1) cuya actividad antiprotozoaria,  $IC_{50}$  (nM), fue ensayada previamente *in vitro* con *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. brucei rhodesiense*) STIB900 (8). Las moléculas dicationicas derivadas del isoaxazol, representadas en la Tabla 1, se diseñaron *in silico* con el programa ChemDraw® Professional 15.1 (PerkinElmer Inc.) para el posterior cálculo de índices topológicos.

**Tabla 1. Estructuras de los Derivados Cationicos del Difenilisoaxazol y su actividad anti-*T. brucei rhodesiense*  $IC_{50}$  (nM).**

Compuesto	X <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	$IC_{50}$ (nM) <i>T. brucei</i> <i>rhodesiense</i>
Estructuras base de los Derivados Cationicos del Difenilisoaxazol					

1	<i>p</i> -Am	H	H	H	1719
2	H	H	H	<i>p</i> -Am	1121
3	<i>p</i> -Am	H	H	<i>p</i> -Am	5
4	<i>p</i> -iPrAm	H	H	<i>p</i> -iPrAm	196
5	<i>p</i> -Im	H	H	<i>p</i> -Im	87
6	<i>p</i> -Am	NO <sub>2</sub>	H	<i>p</i> -Am	14
7	<i>p</i> -Am	Cl	H	<i>p</i> -Am	16
8	<i>p</i> -Am	OMe	H	<i>p</i> -Am	11
9	<i>p</i> -Am	H	NO <sub>2</sub>	<i>p</i> -Am	32
10	<i>p</i> -Am	H	Cl	<i>p</i> -Am	23
11	<i>p</i> -Am	H	OMe	<i>p</i> -Am	16
12	<i>p</i> -Am	OMe	OMe	<i>p</i> -Am	13
13	<i>p</i> -Am	H	H	<i>m</i> -Am	6
14	<i>p</i> -iPrAm	H	H	<i>m</i> -iPrAm	488
15	<i>p</i> -Im	H	H	<i>m</i> -Im	1554
16	<i>p</i> -Am	NO <sub>2</sub>	H	<i>m</i> -Am	9
17	<i>p</i> -Am	Cl	H	<i>m</i> -Am	6
18	<i>p</i> -Am	OMe	H	<i>m</i> -Am	7
19	<i>p</i> -Am	H	NO <sub>2</sub>	<i>m</i> -Am	51
20	<i>p</i> -Am	H	Cl	<i>m</i> -Am	21
21	<i>p</i> -Am	H	OMe	<i>m</i> -Am	12
22	<i>m</i> -Am	H	H	<i>p</i> -Am	4
23	<i>m</i> -iPrAm	H	H	<i>p</i> -iPrAm	316
24	<i>m</i> -Im	H	H	<i>p</i> -Im	974
25	<i>m</i> -Am	Cl	H	<i>p</i> -Am	21
26	<i>m</i> -Am	OMe	H	<i>p</i> -Am	4
27	<i>m</i> -Am	H	NO <sub>2</sub>	<i>p</i> -Am	19
28	<i>m</i> -Am	H	Cl	<i>p</i> -Am	12
29	<i>m</i> -Am	H	OMe	<i>p</i> -Am	6
30	<i>m</i> -Am	OMe	NO <sub>2</sub>	<i>p</i> -Am	34
31	<i>m</i> -Am	OMe	OMe	<i>p</i> -Am	6
32	<i>m</i> -Am	H	H	<i>m</i> -Am	29
33	<i>m</i> -iPrAm	H	H	<i>m</i> -iPrAm	4983
34	<i>m</i> -Im	H	H	<i>m</i> -Im	18454
35	<i>m</i> -Am	NO <sub>2</sub>	H	<i>m</i> -Am	1628
36	<i>m</i> -Am	Cl	H	<i>m</i> -Am	25
37	<i>m</i> -Am	OMe	H	<i>m</i> -Am	7
38	<i>m</i> -Am	H	NO <sub>2</sub>	<i>m</i> -Am	85
39	<i>m</i> -Am	H	Cl	<i>m</i> -Am	46
40	<i>m</i> -Am	H	OMe	<i>m</i> -Am	27
41	<i>m</i> -Am	OMe	OMe	<i>m</i> -Am	4
42	<i>m</i> -iPrAm	OMe	OMe	<i>m</i> -iPrAm	374
43	<i>m</i> -Im	OMe	OMe	<i>m</i> -Im	45

## 2.2. Descripciones moleculares

Se calcularon 62 descriptores topológicos con el programa Desmol2 disponible en línea (<http://ahila2017.uv.es/desmol2/index.xhtml>). Se obtuvo los índices de Randić–Kier–Hall hasta el cuarto orden ( ${}^m\chi_t$ ,

${}^m\chi_t^v$ )(19,20), índices topológicos de carga hasta el quinto orden ( $J_m$ ,  $G_m$ ,  $J_m^v$ ,  $G_m^v$ ) (12,21) y los cocientes y diferencias entre los índices de conectividad de valencia y no valencia ( ${}^mC_t = {}^m\chi_t / {}^m\chi_t^v$  y  ${}^mD_t = {}^m\chi_t - {}^m\chi_t^v$ ) descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2. Descriptores utilizados en este estudio.**

Símbolo	Nombre	Definición	Ref.
${}^k\chi_t$ , $k=0-4$ $t=p,c,pc$	Índices derivados de índice de Randić de orden $k$ y tipo path (p), cluster (c) y path-cluster (pc)	${}^k\chi_t = \sum_{j=1}^{k n_t} \left( \prod_{i \in S_j} \delta_i \right)^{-1/2}$ Donde $\delta_i$ es el número de enlaces, $\sigma$ or $\pi$ , del átomo $i$ para átomos no hidrogenados. $S_j$ es la sub-estructura $j$ th de orden $k$ y tipo $t$ .	(20)
${}^k\chi_t^V$ , $k=0-4$ $t=p,c,pc$	Índices de Kier-Hall de orden $k$ y tipo path (p), cluster (c) y path-cluster (pc)	${}^k\chi_t^V = \sum_{j=1}^{k n_t} \left( \prod_{i \in S_j} \delta_i^V \right)^{-1/2}$ Donde $\delta_i^V$ es la valencia de Kier-Hall de los átomos. $S_j$ es la sub-estructura $j$ th de orden $k$ y tipo $t$ .	(20)
$G_k$ , $k=1-5$	Índices topológicos de carga de orden $k$	$G_k = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N  M_{ij} - M_{ji}  \Leftrightarrow \delta(k, D_{ij})$ Donde $M=AQ$ es el producto de la matriz de adyacencia y del inverso del cuadrado de la matriz de distancia para el grafo molecular de hidrógenos suprimidos. $D$ es la matriz de distancia. $\delta$ es el Kronecker delta	(12)
$G_k^V$ , $k=1-5$	Índices de valencia topológica de carga de orden $k$	$G_k^V = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N  M_{ij}^V - M_{ji}^V  \delta(k, D_{ij})$ Donde $M^V=A^VQ$ es el producto de la matriz de adyacencia de electronegatividad modificada y del inverso del cuadrado de la matriz de distancia para el grafo molecular de hidrógenos suprimidos. $D$ es la matriz de distancia. $\delta$ es el Kronecker delta	(12)
$J_k$ , $k=1-5$	Índices topológicos de carga normalizados de orden $k$	$J_k = \frac{G_k}{N-1}$	(12)
$J_k^V$ , $k=1-5$	Índices topológicos de carga de valencia normalizada de orden $k$	$J_k^V = \frac{G_k^V}{N-1}$	(12)
${}^kD_t$ , $k=0-4$ $t=p,c,pc$	Diferencias de conectividad de orden $k$ tipo path (p), cluster (c) y path-cluster (pc)	${}^kD_t = {}^k\chi_t - {}^k\chi_t^V$	(22)
${}^kC_t$ , $k=0-4$ $t=p,c,pc$	Cocientes de conectividad de orden $k$ y tipo path (p), cluster (c) y path-cluster (pc)	${}^kC_t = \frac{{}^k\chi_t}{{}^k\chi_t^V}$	(22)

### 2.3. Algoritmos QSAR

#### 2.3.a. Análisis lineal discriminante

Con el objetivo de identificar correctamente la actividad/inactividad anti-*T. brucei* ( $IC_{50}$ ) del subgrupo de 3,5-difenilisoxazoles dicatiónicos ( $n^\circ$  1-43) se realizó el análisis lineal discriminante (ALD) con el programa STATISTICA 8 (Statsoft Inc, Tulsa, Okla) (23). Se clasificó a los compuestos en dos grupos según su actividad anti-*T. brucei*: activos *in vitro* ( $IC_{50} < 50nM$ ) e inactivos *in vitro* ( $IC_{50} > 50nM$ ). Se seleccionó un modelo de ALD estadísticamente significativo con capacidad discriminante medida con el coeficiente Lambda de Wilks. El diagrama de distribución de la actividad anti-*T. brucei* (PDD) se realizó con la función discriminante de cada compuesto, calculada con la ecuación de discriminación y la expectativa de actividad/inactividad. La expectativa de actividad se calculó con la ecuación ( $Ea = a/(i+1)$ ) y la de inactividad con ( $Ei = i/(a+1)$ ); donde "a" es la fracción de compuestos activos en el intervalo entre el número total de compuestos activos, e "i" es la fracción de compuestos inactivos en el intervalo entre el número total de compuestos inactivos.

#### 2.3.b. Análisis de regresión multilínea

Se realizó el análisis de regresión multilínea (MLRA) para predecir los valores de  $IC_{50}$  *in silico*. Los valores experimentales de  $IC_{50}$  se transformaron a su logaritmo negativo ( $pIC_{50}$ ) expresado en concentración molar. La ecuación de predicción se obtuvo correlacionando los valores experimentales ( $pIC_{50}$  *in vitro*) con los índices topológicos en el programa STATISTICA 8 (Statsoft Inc, Tulsa, Okla)(23). La selección de la mejor ecuación se basó en el valor de regresión con el menor número de descriptores (24), significancia estadística ( $p \leq 0,05$ ) y error estándar de estimación inferior al 10 % de variabilidad de la actividad estudiada. Para validar el modelo de MLRA escogido se realizó un test interno y uno de aleatoriedad. El test de validación interna o cros-validación se basó en el algoritmo *leave-one-out* que consiste en eliminar un caso y realizar el análisis de regresión con los casos restantes y sus descriptores, para posteriormente predecir el valor de la propiedad del caso retirado. El procedimiento se repitió 43 veces (igual al número de casos) y se calculó el coeficiente de predicción que informa la calidad de la función seleccionada (25). El test de aleatoriedad se realizó intercambiando al azar los valores de  $pIC_{50}$  entre los compuestos y realizando la regresión con los mismos descriptores del modelo. Este proceso se llevó a cabo 10 veces y se calculó los valores de  $r^2$  y  $q^2$  de cada uno para

luego compararlos con el seleccionado.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se predijo con elevada exactitud la actividad anti-*T. brucei* de 43 análogos del 3,5-difenilisoxazol, empleando métodos computacionales basados en relaciones cuantitativas de estructura-actividad (QSAR). En primer lugar, se seleccionó un modelo de ALD estadísticamente significativo para identificar la actividad/inactividad anti-*T. brucei* (IC<sub>50</sub>) del subgrupo de 43 compuestos análogos del isoxazol. Este modelo incluyó dos variables: IT de Kier de orden 4, tipo path (p) (<sup>4</sup>χ<sub>p</sub>) e IT de carga de orden 2 (G<sub>2</sub>) cuya ecuación discriminante para análogos del 3,5-difenilisoxazol se describe a continuación.

$$FD = -18,35 - 15,05 \chi_p + 5,10 G_2$$

$$n=43; \lambda = 0,274; F(40,2) = 52,96; p < 0,0001$$

Ecuación 1

Una vez que el modelo de ALD fue aplicado a los 43

**Tabla 3. Resultados de la predicción obtenida por regresión multilínea y análisis lineal discriminante de la IC<sub>50</sub> de *T. brucei* en el grupo de entrenamiento.**

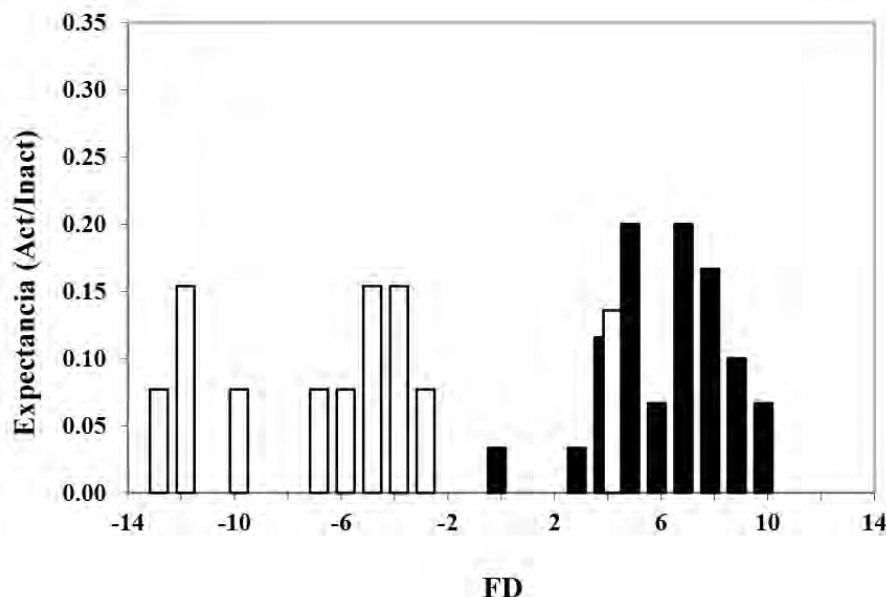
Compuesto	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup> exp.	Clasif. exp. <sup>b</sup>	Probabilidad de Actividad	FD <sup>c</sup>	Clasif. calc. <sup>d</sup>	pIC <sub>50</sub> exp.	pIC <sub>50</sub> calc.	pIC <sub>50</sub> calc. <sup>e</sup>
1	1719	i	0,02	-4,0	i	5,77	5,61	5,54
2	1121	i	0,02	-4,0	i	5,95	5,61	5,46
3	5	A	1,00	5,9	A	8,29	8,32	8,32
4	196	i	0,00	-9,8	i	6,71	6,72	6,72
5	87	i	0,08	-2,5	i	7,06	6,70	6,60
6	14	A	1,00	5,7	A	7,86	7,69	7,68
7	16	A	1,00	9,3	A	7,81	8,15	8,18
8	11	A	1,00	7,2	A	7,98	8,03	8,03
9	32	A	1,00	5,9	A	7,49	7,77	7,79
10	23	A	1,00	9,5	A	7,64	8,32	8,41
11	16	A	1,00	7,3	A	7,79	8,13	8,15
12	13	A	1,00	8,6	A	7,89	8,04	8,05
13	6	A	0,99	4,6	A	8,20	8,08	8,07
14	488	i	0,00	-11,3	i	6,31	6,00	5,92
15	1554	i	0,02	-3,9	i	5,81	6,14	6,21
16	9	A	0,99	4,4	A	8,05	7,38	7,31
17	6	A	1,00	7,9	A	8,20	7,88	7,86
18	7	A	1,00	5,8	A	8,19	7,74	7,72
19	51	A	1,00	5,8	A	7,29	7,50	7,52
20	21	A	1,00	10,3	A	7,67	7,89	7,91
21	12	A	1,00	7,5	A	7,93	8,02	8,03
22	4	A	0,99	4,6	A	8,46	8,09	8,06
23	316	i	0,00	-11,3	i	6,50	6,01	5,90
24	974	i	0,02	-3,9	i	6,01	6,16	6,19
25	21	A	1,00	10,1	A	7,68	7,73	7,74
26	4	A	1,00	7,4	A	8,37	7,94	7,92
27	19	A	0,99	4,5	A	7,71	7,47	7,45
28	12	A	1,00	8,1	A	7,94	8,07	8,08
29	6	A	1,00	6,0	A	8,23	7,85	7,84
30	34	A	1,00	7,3	A	7,47	7,62	7,64
31	6	A	1,00	8,8	A	8,24	7,90	7,88
32	29	A	0,96	3,2	A	7,54	7,85	7,87
33	4983	i	0,00	-12,7	i	5,30	5,30	5,29

compuestos estudiados se observó una sensibilidad del 100 %, especificidad del 86,67 % y una exactitud del 95,56 %. De entre los 43 compuestos 30 fueron activos tanto *in vitro* como *in silico*; mientras que de los 13 compuestos restantes que fueron inactivos *in vitro*, 11 fueron inactivos *in silico* y dos erróneamente clasificados como activos (falsos activos). Asimismo, el diagrama de distribución de la actividad anti-*T. brucei* mostró una capacidad discriminante del modelo aceptable, donde los compuestos inactivos se agrupan entre valores de -2 y -13 y los activos entre 2 y 11 (Tabla 3). Dos de las moléculas inactivas fueron clasificadas en el rango de activos (n° 35 FD=4,27 y n° 38 FD=4,39) y una de las activas en un rango intermedio (n° 43 FD=0,46) (Tabla 3; Figura 1). La función discriminante clasifica a los compuestos con valores superiores a 0 como activos (A) y menores a 0 como inactivos (i), por lo que los resultados obtenidos en su mayoría concuerdan con la teoría.



34	18454	i	0,01	-5,4	i	4,73	5,60	5,79
35	1628	i	0,99	4,3	A	5,79	7,12	7,32
36	25	A	1,00	8,7	A	7,60	7,47	7,46
37	7	A	1,00	6,0	A	8,13	7,65	7,63
38	85	i	0,99	4,4	A	7,07	7,21	7,22
39	46	A	1,00	8,9	A	7,33	7,64	7,66
40	27	A	1,00	6,2	A	7,57	7,75	7,76
41	4	A	1,00	9,0	A	8,38	7,76	7,72
42	374	i	0,00	-6,9	i	6,43	6,80	6,96

<sup>a</sup> Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en estudio previo(8) <sup>b</sup>A=activos (IC<sub>50</sub><50nM); i=inactivos (IC<sub>50</sub>>50nM) <sup>c</sup>Función discriminante obtenida con la ecuación 1 <sup>d</sup>A=activos (FD>0); i=inactivos (FD<0) <sup>e</sup>Calculado con el test interno de cross-validación.



**Figura 1. Diagrama de la distribución farmacológica de la actividad anti-*T. brucei* mediante la relación entre expectativa (E) y función discriminante (las barras negras representan los compuestos con IC<sub>50</sub> <50 nM y las barras blancas los compuestos con IC<sub>50</sub> >50 nM).**

En segundo lugar, mediante el análisis de regresión multilíneal se seleccionó un modelo de predicción de pIC<sub>50</sub> estadísticamente significativo. Este modelo incluyó cuatro descriptores topológicos: índice de Kier-Hall de orden 3 y tipo cluster (<sup>3</sup>χ<sub>c</sub><sup>v</sup>), el IT de carga normalizado de orden 1 (J<sub>1</sub>), diferencias de conectividad de orden 4 tipo path (D<sup>4</sup>χ<sub>p</sub>) y el índice de Wiener (W), descritos en la Ecuación 2 de predicción del MLRA para análogos del 3,5-difenilisoxazol.

$$pIC_{50} = -1,09 - 16,66 \text{ } ^3\chi_c^v + 53,52 J_1 - 8,60 D^4\chi_p + 0,008 W$$

$$n=43; R^2=0,816; F(38,4)=42,2; p=0; EEE=0,42; Q^2=0,759$$

Ecuación 2

El modelo de predicción del MLRA obtuvo una correlación alta-positiva, entre los valores de pIC<sub>50</sub> calculados y experimentales, y la cross-validación arrojó un valor de q<sup>2</sup>=0,759, que muestra la alta capacidad predictiva de los valores de pIC<sub>50</sub> observados en la Tabla 3 y en la Figura 2.

Por otro lado, el test de aleatoriedad confirma que el modelo responde a un patrón topológico y no es de tipo estocástico, debido a los bajos valores de r<sup>2</sup> y q<sup>2</sup> que se obtienen al modificar los valores de pIC<sub>50</sub> al azar representados en la Figura 3.

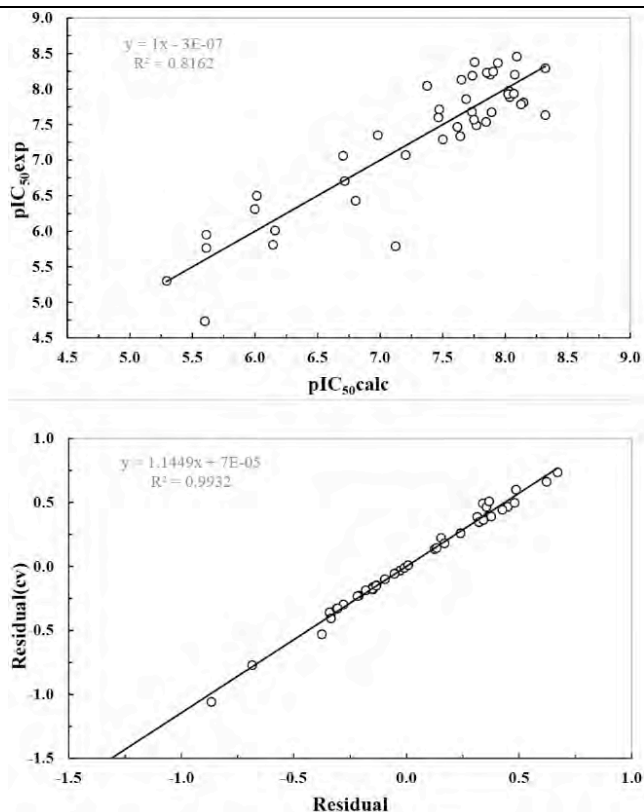


Figura 2. Predicción de inhibición del crecimiento de *T. brucei rhodesiense* pIC<sub>50</sub> para el grupo de derivados 3,5-Difenilisoxazoles Dicationicos. Arriba: representación gráfica de pIC<sub>50</sub> experimental frente al pIC<sub>50</sub> calculado a partir de la ecuación 2. Abajo: representación gráfica de los residuales obtenidos en la validación cruzada frente a los obtenidos en el grupo de entrenamiento.

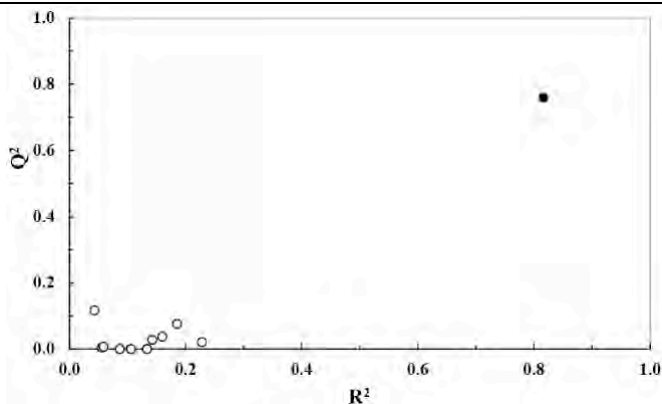
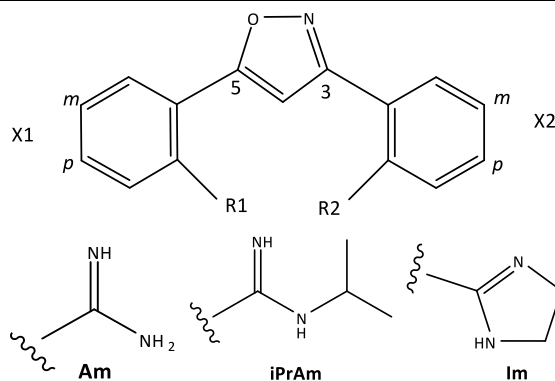


Figura 3. Test de aleatoriedad del grupo de entrenamiento manipulando los valores de pIC<sub>50</sub> y correlacionando los valores de  $r^2$  y  $q^2$ . El punto negro indica los valores de  $r^2$  y  $q^2$  obtenidos para el modelo seleccionado.

En consecuencia, los métodos QSAR para este grupo de compuestos dicationicos (grupo de entrenamiento) permiten discriminar de forma altamente fiable su actividad anti-*T. brucei* y su potencia en términos de pIC<sub>50</sub> ( $r^2=0,816$ ).

Finalmente, a partir de las moléculas con valores de IC<sub>50</sub> más bajos se diseñaron 28 análogos en los que se aplicaron los modelos QSAR adicionando dos radicales nuevos: Bromo (Br) y grupo etoxilo (OEt). El rango de la función discriminante de este grupo de compuestos para

cribado molecular comprendió valores entre 3 y 14, clasificándose todos ellos como activos, entre los cuales se destacan compuestos con elevada potencia teórica (Tabla 4). En cuanto al análisis de regresión multilíneal, este grupo de compuestos arrojó valores de entre 7,4 y 9,3 (Tabla 4), los cuales están en un rango similar al del grupo de entrenamiento donde los compuestos activos presentan valores de entre 7,3 y 8,5 y los inactivos entre 4,7 y 7,1 (Tabla 3).

**Tabla 4. Resultados de la predicción obtenida por regresión multilíneal y análisis lineal discriminante de la IC<sub>50</sub> de *T. brucei* en el grupo testado.****Estructuras base de los Derivados Catiónicos del Difenilisoxazol.**

Compuesto	X <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	FD	pIC <sub>50</sub> calc
1t	<i>m</i> -Am	Br	H	<i>p</i> -Am	10,1	7,78
2t	<i>m</i> -Am	OEt	H	<i>p</i> -Am	4,7	8,12
3t	<i>m</i> -Am	Br	OMe	<i>p</i> -Am	11,5	7,58
4t	<i>m</i> -Am	OEt	OMe	<i>p</i> -Am	6,1	8,28
5t	<i>m</i> -Am	Br	Cl	<i>p</i> -Am	13,6	7,73
6t	<i>m</i> -Am	OEt	Cl	<i>p</i> -Am	8,2	8,18
7t*	<i>m</i> -Am	H	Br	<i>p</i> -Am	9,1	9,31
8t	<i>m</i> -Am	H	OEt	<i>p</i> -Am	3,2	7,97
9t*	<i>m</i> -Am	OMe	Br	<i>p</i> -Am	10,9	8,59
10t	<i>m</i> -Am	OMe	OEt	<i>p</i> -Am	6,0	8,22
11t	<i>m</i> -Am	Cl	Br	<i>p</i> -Am	13,6	8,32
12t	<i>m</i> -Am	Cl	OEt	<i>p</i> -Am	8,7	7,69
13t	<i>m</i> -Am	OMe	OEt	<i>m</i> -Am	6,3	8,11
14t	<i>m</i> -Am	OMe	Br	<i>m</i> -Am	11,8	7,55
15t	<i>m</i> -Am	OEt	OMe	<i>m</i> -Am	6,3	8,11
16t	<i>m</i> -Am	Br	OMe	<i>m</i> -Am	11,7	7,45
17t*	<i>p</i> -Am	Br	H	<i>p</i> -Am	9,3	8,76
18t	<i>p</i> -Am	OEt	H	<i>p</i> -Am	4,4	8,16
19t*	<i>p</i> -Am	Br	OMe	<i>p</i> -Am	10,6	8,59
20t	<i>p</i> -Am	OEt	OMe	<i>p</i> -Am	5,8	8,37
21t*	<i>p</i> -Am	Br	Cl	<i>p</i> -Am	12,8	8,73
22t	<i>p</i> -Am	OEt	Cl	<i>p</i> -Am	7,9	8,25
23t*	<i>p</i> -Am	H	Br	<i>p</i> -Am	9,5	8,96
24t	<i>p</i> -Am	H	OEt	<i>p</i> -Am	4,6	8,26
25t*	<i>p</i> -Am	OMe	Br	<i>p</i> -Am	10,7	8,70
26t	<i>p</i> -Am	OMe	OEt	<i>p</i> -Am	5,8	8,37
27t*	<i>p</i> -Am	Cl	Br	<i>p</i> -Am	12,8	8,76
28t	<i>p</i> -Am	Cl	OEt	<i>p</i> -Am	7,9	8,18

\*Compuestos destacados por tener valores de pIC<sub>50</sub> ≥ 8,5, que representan valores de IC<sub>50</sub> ≤ 3nM (actividad elevada).

#### 4. CONCLUSIONES

Los modelos QSAR basados en la topología molecular empleados en este trabajo, han permitido predecir con elevada exactitud (95,6 %) la actividad anti-*Trypanosoma brucei rhodesiense* del grupo de 3,5-Difenilisoxazoles dicationicos analizado. El análisis discriminante predijo correctamente la actividad anti-*Trypanosoma brucei* en el 100 % de los casos y la inactividad en el 86,7 %. Adicionalmente, el análisis de regresión multilíneal mostró

una alta correlación entre los resultados de pIC<sub>50</sub> predichos y los obtenidos *in vitro*. Por último, la aplicación de los modelos permitió identificar un grupo de moléculas con alta bioactividad teórica, comprobada con el análisis discriminante y el de regresión multilíneal.

Este estudio muestra la utilidad de la topología molecular para predecir la actividad antiprotozoaria de nuevos compuestos químicos ahorrando tiempo y costes en la búsqueda de futuros tratamientos, ante la aparición de

resistencias y la necesidad de un espectro más amplio de fármacos que sean de fácil administración y baja toxicidad.

## 5. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Master de Enfermedades Parasitarias Tropicales de la Universitat de València por su apoyo en la realización de este trabajo.

## 7. REFERENCIAS

1. WHO: World Health Organization. La tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño). 2016 [acceso 14 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/es/>
2. Simarro PP, Jannin J, Cattand P. Eliminating human African trypanosomiasis: Where do we stand and what comes next? *PLoS Med.* 2008;5(2):0174–80.
3. Simarro PP, Diarra A, Postigo JAR, Franco JR, Jannin JG. The human african trypanosomiasis control and surveillance programme of the world health organization 2000-2009: The way forward. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(2).
4. Organización Mundial de la Salud. Relevé épidémiologique hebdomadaire. Weekly epidemiological record [revista en internet]. 2006 febrero. [acceso 14 de diciembre 2016];81(8). Disponible en:<http://www.who.int/wer/2006/wer8108.pdf>.
5. Silva MRS. Avaliação fenotípica in vitro de novas amidinas aromáticas sobre *Trypanosoma cruzi* [tesis doctoral]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz;2015.
6. da Silva CF. Atividade de amidinas aromáticas sobre *Trypanosoma Cruzi*: estudos in vitro e in vivo [tesis doctoral]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz; 2011.
7. Ríos-Martínez C. Síntesis y estudio de nuevos agentes antiprotozoarios derivados de compuestos dicationicos para el tratamiento de la tripanosomiasis africana humana [tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid; 2014. [acceso 01 de abril de 2017] Available from: <http://eprints.ucm.es/25956/1/T35418.pdf>
8. Patrick DA, Bakunov SA, Bakunova SM, Kumar EVKS, Lombardy RJ, Jones SK, et al. Synthesis and in vitro antiprotozoal activities of dicationic 3,5-diphenylisoxazoles. *J Med Chem.* 2007;50(10):2468–85.
9. Amigó JM, Gálvez J, Villar VM. A review on molecular topology: applying graph theory to drug discovery and design. *Naturwissenschaften.* Springer; 2009;96(7):749–61.
10. Gálvez J, Gálvez-Llompарт M, García-Domenech R. Molecular topology as a novel approach for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* Taylor & Francis; 2012;7(2):133–53.
11. Garcia-Domenech R, Galvez J, de Julian-Ortiz JV, Pogliani L. Some new trends in chemical graph theory. *Chem Rev* 2008 Mar;108(3):1127-1169
12. Galvez J, Garcia R, Salabert MT, Soler R. Charge indexes. New topological descriptors. *J Chem Inf Comput Sci.* ACS Publications; 1994; 34(3):520–5.
13. Bretón JR, Torrico C, Torrico N, Gálvez-Llompарт M, Gálvez J, García-Domenech R. Aplicación de topología molecular a la predicción de la actividad frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense* de compuestos bicíclicos derivados de la 4-metilpiperazina. *Nereis*, 2015; (7):27–38.
14. Fernández BG, Zanni R, Pellicer M, Llompарт MG, Domenech RG. Aplicación de la topología molecular en la búsqueda de nuevos compuestos derivados del 4-nitro-imidazol activos frente al *Trypanosoma brucei*. *An. R. Acad. Nac. Farm* 2012; 78(4).
15. López AD, Gómez II, Moreira LR, Álvarez JG, Domenech RG. Aplicación de la topología molecular en la predicción de la actividad antiprotozoaria de derivados del benzimidazol. *Nereis Rev Iberoam Interdiscip métodos, Model y simulación.* 2013;(5):9–18.
16. Jiménez Mateo A, Santano García R, Martín Sarmiento A, García Guidet L, Gálvez J, Garcia-Domenech R. Application of molecular topology for predicting the leishmanicidal activity of a group of compounds derived from pyrrolo [1,2-  $\alpha$  ] quinoxaline. *An. Real Acad. Farm.* 2016;82(3):317-23.
17. Mahmoudi N, Garcia-Domenech R, Galvez J, Farhati K, Franetich JF, Sauerwein R, et al. New active drugs against liver stages of *Plasmodium* predicted by molecular topology. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1215–20.
18. García-García Á, Gálvez J, de Julián-Ortiz J-V, García-Domenech R, Muñoz C, Guna R, et al. New agents active against *Mycobacterium avium* complex selected by molecular topology: a virtual screening method. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jan 1;53(1):65–73.
19. Kier LB, Murray WJ, Randić M, Hall LH. Molecular connectivity V: connectivity series concept applied to density. *J Pharm Sci.* Wiley Online Library; 1976;65(8):1226–30.
20. Kier LB, Hall LH. General definition of valence delta values for molecular connectivity. *J Pharm Sci.* Wiley Online Library; 1983;72(10):1170–3.
21. Galvez J, Garcia-Domenech R, De Julian-Ortiz V, Soler R. Topological approach to analgesia. *J Chem Inf Comput Sci.* ACS Publications; 1994;34(5):1198–203.
22. Galvez J, Garcia-Domenech R, de Julian-Ortiz J V, Soler R. Topological approach to drug design. *J Chem Inf Comput Sci.* United States; 1995;35(2):272–84.
23. StatSoft I. *Statistica* (data analysis software system). Version 8.0. 2007. 2010.

24. Hocking RR. Criteria for selection of a subset regression: which one should be used? *Technometrics*. Taylor & Francis; 1972;14(4):967–76.
25. Besalú E. Fast computation of cross-validated properties in full linear leave-many-out procedures. *J Math Chem*. Springer; 2001;29(3):191–204.





## Recientes avances en la hepatotoxicidad de fármacos



María Cascales Angosto  
Coordinadora de la sesión  
Sesión celebrada el 18 de mayo de 2017  
e-mail: cascales1934@gmail.com

---

### ORDEN DEL DÍA

#### *Introducción:*

---

Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto  
Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

#### *Ponentes:*

---

#### **“Modelos celulares hepáticos avanzados para el estudio preclínico del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos”**

Dra. María José Gómez-Lechón Moliner

Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

#### **“Hepatotoxicidad idiosincrásica por fármacos: promesas y limitaciones de las estrategias *in vitro*”**

Dra. M. Teresa Donato

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València. Unidad Mixta de Investigación en Hepatología Experimental UV-Fundación La Fe, Valencia

#### **“Esteatosis hepática y colestasis inducida por medicamentos: nuevos mecanismos y biomarcadores”**

Dr. Ramiro Jover Atienza

Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València. Unidad Mixta en Hepatología Experimental, IIS Hospital La Fe de Valencia



# Introducción

María Cascales Angosto

---

Durante muchos años la hepatotoxicidad de fármacos y agentes tóxicos, ha sido el centro de mis investigaciones cuando ejercía mi carrera como Investigadora del CSIC y prueba de ello han sido diversas mis intervenciones en esta Academia sobre este tema. Hoy la Doctora Gómez-Lechón y yo hemos querido traer a esta Tribuna los últimos avances y técnicas emergentes que evalúan los mecanismos implicados en la biotransformación de fármacos por el hígado, como etapa temprana para predecir la toxicidad de los nuevos medicamentos.

El organismo identifica a casi todos los medicamentos como xenobióticos y los somete a una serie de procesos para hacerlos más solubles y facilitar su eliminación por vía biliar o plasmática. A pesar de que casi todas las células del organismo poseen esta capacidad, es el retículo endoplásmico del hepatocito, el lugar principal del metabolismo de las sustancias químicas tanto endógenas como exógenas. Esta misión del hígado en la biotransformación de fármacos, hace que sea el órgano más susceptible a ser lesionado.

La lesión funcional o anatómica del hígado inducida por medicamentos es un importante problema de salud pública, de tal manera que es la causa más común de muerte por fallo hepático agudo y representa alrededor del 10 % de ingresos hospitalarios. Existen más de 900 medicamentos reconocidos por su toxicidad que pueden causar insuficiencia hepática acompañada, en casos graves, de encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal y muerte. Esta es una de las causas que conduce a la restricción del uso de los medicamentos y a su eliminación del mercado.

Los ensayos preclínicos deben ser capaces de detectar la toxicidad potencial en las fases tempranas del desarrollo de un nuevo fármaco, con el objeto no solo de aminorar los riesgos de reacciones adversas sino también de evitar las pérdidas financieras que ello conlleva. Sin embargo, los ensayos de toxicidad existentes en la actualidad son a menudo insuficientes como lo demuestra el alto grado de fracaso de fármacos candidatos y medicamentos en curso. Los estudios en animales de laboratorio a menudo fracasan debido a las diferencias existentes en los sistemas de detoxificación entre especies.

Los modelos celulares de origen humano están en la actualidad siendo utilizados para evaluar el potencial hepatotóxico de nuevas moléculas. Aunque no pueden reproducir la toxicidad potencial del órgano completo, su bajo costo y reproducibilidad, las convierte en un buen complemento a las pruebas tradicionales *in vivo*. Esta ampliamente demostrada su disponibilidad para evaluar los procesos celulares y moleculares implicados en la hepatotoxicidad y su capacidad para detectar los potenciales efectos secundarios de las nuevas entidades moleculares antes de que se introduzcan en pruebas clínicas.

## *Vulnerabilidad del hígado a la lesión tóxica*

El hígado es el órgano más susceptible de sufrir lesiones tóxicas, debido a su peculiar metabolismo de los xenobióticos y a su cercanía con el tracto gastrointestinal. Cerca de un 75 % de la sangre que llega al hígado procede directamente del sistema gastrointestinal a través de la vena porta, la cual acarrea los xenobióticos de forma concentrada. La presencia de estos en el hepatocito activa el sistema citocromo P450, por ejemplo el CYP2E1, con generación de radicales libres derivados de la biotransformación del fármaco y del oxígeno. Las lesiones a los hepatocitos y a las células del conducto biliar producen inflamación y acúmulo de bilis en el propio hepatocito. Otras células no pertenecientes al parénquima hepático, como los colangiocitos, las células almacenadoras de grasa o células de Ito, las células de Kupfer y los propios leucocitos ejercen una influencia importante en estos mecanismos tóxicos.

Los eventos moleculares que conducen a la lesión y muerte de las células hepáticas por acción de los fármacos pueden ser debidos a la acción directa de dichos fármacos sobre los sistemas celulares o a la acción de los productos derivados de su biotransformación. En este último caso el efecto tóxico que se desencadena se debe a una alteración del equilibrio entre bioactivación y detoxificación, que es la que determina el grado de agresión hepatocelular del metabolito reactivo derivado. Existen varios procesos que juegan un papel en estos eventos que pueden conducir a un daño celular irreversible por necrosis o apoptosis. A su vez, las reacciones adversas a los medicamentos son de dos tipos; las farmacológicas o intrínsecas y las idiosincráticas. Las primeras reflejan el 80 % de todas las reacciones adversas. Los fármacos que exhiben el efecto intrínseco son aquellos que muestran curvas de dosis-respuesta que se pueden predecir, de modo que a mayor concentración, mayor será el daño hepático, y presentan mecanismos bien caracterizados tales como la agresión directa hepatocelular o el bloqueo de un proceso metabólico. Ejemplo clásico es el acetaminofeno o paracetamol.

Las reacciones idiosincráticas causan hepatotoxicidad inesperada en individuos susceptibles no relacionada con la dosis y con un período de latencia variable. Este tipo de lesión no tiene una curva clara de dosis respuesta ni una relación temporal y en la mayoría de los casos no sigue modelos que se puedan predecir. La hepatotoxicidad idiosincrática ha producido la retirada de muchos medicamentos del mercado, aún después de un riguroso estudio clínico como parte del proceso de su aprobación y patente. Ejemplos clásicos de este fenómeno lo presentan la troglitazona y la trovafloxacina.

### ***Biotransformación de fármacos en hígado***

Este proceso se verifica en dos fases: la fase 1 incluye un conjunto de reacciones catalizadas por el complejo citocromo P 450, que aumentan la solubilidad del agente tóxico generando, a su vez, metabolitos químicamente activos y potencialmente tóxicos. La fase 2 incluye reacciones de conjugación con compuestos endógenos por medio de transferasas. Al final de la fase 2, los productos activos generados en la fase 1 se vuelven relativamente inertes y disponibles para su eliminación del organismo.

El *complejo citocromo P450* comprende un grupo de enzimas localizadas en el retículo endoplasmático del hepatocito, que cuenta con unas 50 isoformas relacionadas entre sí, de las cuales 6 de ellas metabolizan un 90 % de los xenobióticos. Existe una gran diversidad en los genes que codifican los citocromos P450 individuales y esta heterogenicidad le permite al hígado oxidar en una enorme variedad de compuestos químicos, durante la fase 1.

Hay tres elementos en el sistema P450 que juegan un papel importante en la toxicidad inducida por medicamentos.

La diversidad o *polimorfismo genético*, causante de la variabilidad en el metabolismo de fármacos entre un individuo y el otro. Este polimorfismo es de gran importancia frente a la sensibilidad o resistencia a los efectos del medicamento a dosis terapéuticas y es responsable de las respuestas entre una persona y otra en especial cuando se trata de etnias diferentes.

El cambio en actividad enzimática producido por medicamentos que ejercen influencia positiva o negativa sobre la actividad de los sistemas P450. Los fármacos que la modifican se conocen como inhibidores o activadores. Los inhibidores impiden la actividad de una o varias enzimas P450. Los activadores aumentan su actividad porque elevan su expresión genética y aumentan la velocidad de biotransformación de los fármacos con consecuencias terapéuticas importantes. Algunos fármacos pueden compartir especificidad por la misma enzima P450 compitiendo por su biotransformación. Ejemplo el etanol.

*Otros factores* afectan la biotransformación hepática e influyen en su acción terapéutica: edad, sexo, peso corporal, estado nutricional, hepatopatía previa, función renal, embarazo, interacciones medicamentosas, etnia, etc.

#### ***Tipos de lesión hepática producida por fármacos:***

*Necrosis hepatocelular.* Lo más común es encontrar necrosis de las células hepáticas confinadas en las zonas periportal o perovenosa del lóbulo hepático. Se manifiesta con altos niveles sanguíneos de ALT y disfunciones hepáticas severas que con el tiempo conlleva a insuficiencia hepática aguda. Las causas más frecuentes son las intoxicaciones por acetaminofeno y el tetracloruro de carbono

*Hepatitis.* Es otra forma de necrosis hepatocelular, asociada a infiltración de células inflamatorias. Pueden aparecer tres tipos de hepatitis inducida por fármacos: tipo viral causada por halotano isoniácida y fenitoina; la focal o no-específica, caracterizada por focos esparcidos que

acompañan al infiltrado linfocítico. Un ejemplo de este tipo de lesión es la producida por la aspirina; y la crónica, cuadro clínico, serológico e histológico similar a la hepatitis autoinmune. Actúan de este modo las intoxicaciones por metildopa y diclofenac.

*Coolestasis.* El daño hepático produce un trastorno en el flujo biliar, en el que predomina la ictericia. Se puede detectar inflamación (hepatitis colestásica) o sin inflamación (parenquimatosas). Producen colestasis la píldora anticonceptiva, anabolizantes androgénicos esteroides y andrógenos. La inflamatoria está producida por: alopurinol, carbamazepina, clorpromazina, flucloxacilina, etc

*Esteatosis.* La hepatotoxicidad puede manifestarse por acumulo de triglicéridos lo que conlleva al hígado graso micro o macrovesicular. Otro tipo de esteatosis se produce por acumulación de fosfolípidos y produce un patrón similar a las enfermedades con defectos congénitos del metabolismo lipídico. Causas: aspirina, cetoprofen, tetraciclina, acetaminofeno, metotrexato, amiodarona y nutrición parenteral absoluta, entre otros.

En resumen, el daño hepático inducido por fármacos supone hoy un importante problema de salud pública y una de las causas principales de disfunción hepática y muerte por fallo hepático agudo, que conlleva la retirada del mercado de medicamentos ya autorizados. En las diferentes fases del desarrollo de un nuevo fármaco tiene una extraordinaria relevancia la detección temprana de los posibles efectos hepáticos adversos. Los estudios preclínicos en animales son poco predictivos de la toxicidad en el hombre, por ello se ha potenciado el uso de modelos celulares hepáticos de origen humano para la evaluación de la seguridad de los fármacos. Existe una necesidad urgente de conseguir biomarcadores eficientes para la evaluación del riesgo de los pacientes a quienes van dirigidos esos medicamentos. En la actualidad las investigaciones están dirigidas a profundizar en los problemas clínicos con el fin de desarrollar estrategias diagnósticas con modelos celulares complejos capaces de mimetizar el comportamiento del hígado humano y utilizar tecnologías analíticas avanzadas para el estudio de las bases moleculares del metabolismo y la hepatotoxicidad de una molécula candidata a ser registrada como un nuevo medicamento.

\*\*\*\*\*

En la Sesión Científica que presentamos hoy actúan como ponentes tres investigadores de talla internacional, la Académica María José Gómez-Lechón Moliner y dos miembros de su grupo, los doctores María Teresa Donato Martín y Ricardo Jover Atienza. La Doctora Gómez-Lechón es conocida por todos nosotros por su intervención en las actividades de esta casa en diversas ocasiones, que se plasmaron en dos Monografías: Citocromo P-450 y las Ómicas.

La línea de investigación del grupo dirigido por la Doctora Gómez-Lechón se encuentra integrada en un equipo multidisciplinar con participación de los clínicos del hospital La Fe de Valencia. Concentra los mecanismos

de hepatotoxicidad de fármacos así como la hepatotoxicidad idiosincrática. Han desarrollado estudios multiparamétricos basados en análisis de imagen, metabolómica y transcricción y están tratando de hacer una investigación cada vez más traslacional. La terapia celular hepática, tiene en marcha el primer programa de trasplante de hepatocitos en España en pacientes pediátricos con metabolopatías congénitas y en adultos con fallo hepático agudo. También están empezando a generar células iPS como terapia personalizada y líneas de células pluripotentes derivadas de células embrionarias.

A continuación voy a hacer una brevísima presentación de los tres conferenciantes

**María José Gómez Lechón** es doctora en Biología. Investigadora Principal de la Unidad de Hepatología Experimental del Hospital Universitario La Fe. Sus investigaciones sobre el metabolismo de fármacos y mecanismos moleculares de hepatotoxicidad se han enfocado en el desarrollo de modelos *in vitro* con expresión de los citocromos P 450 y su capacidad en la biotransformación de xenobióticos. Su actividad se ha dirigido al desarrollo de modelos celulares que mimeticen el comportamiento del hígado humano para estudios preclínicos del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos.

**María Teresa Donato Martín** es Doctora en Farmacia y Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Valencia. Investigadora de la Unidad de Hepatología Experimental del Hospital Universitario La Fe y Profesora contratada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

Posee amplia experiencia en el estudio de la actividad catalítica del citocromo P 450 y en desarrollo de modelos hepáticos para la evaluación *in vitro* del metabolismo de fármacos en humanos. Hoy nos va a hablar de la Hepatotoxicidad idiosincrática por fármacos.

**Ramiro Jover Atienza** es Doctor en Biología por la Universidad de Valencia, Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia. Ha realizado sus estudios postdoctorales en el Biozentrum de la Universidad de Basilea y sus publicaciones se integran en el área del metabolismo de fármacos y la regulación de la expresión de genes hepáticos. Su actividad más reciente se ha dirigido al estudio de los mecanismos de hepatotoxicidad que causan esteatosis y colestasis; así como a la búsqueda de biomarcadores predictivos. También ha investigado nuevas vías patogénicas en la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

Por urgencia del tiempo, no voy a extenderme en las importantes y numerosas publicaciones de estos tres expertos en hepatología. Todos los que me escuchan tienen acceso a ellas en el índice que recoge la red de publicaciones médicas del NIH.

Para terminar, tengo que agradecer a la Real Academia Nacional de Farmacia, a la Fundación José Casares Gil, así como al personal administrativo de esta casa, por toda

suerte de facilidades prestadas en la realización y organización de esta tarea. Mi profunda gratitud a los ponentes por su generosidad al haber aceptado tomar parte en esta Sesión Científica dedicada a un tema de extraordinaria importancia e indiscutible trascendencia farmacológica y de aplicación terapéutica, que es la biotransformación de fármacos en hígado.

# Modelos celulares hepáticos avanzados para el estudio preclínico del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos

**Title in English:** *Advanced hepatic cellular models for the preclinical study of drug metabolism and hepatotoxicity*

María José Gómez-Lechón Moliner

Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Avenida Fernando Abril Martorel 106, 46026-Valencia.

**ABSTRACT:** Drug-induced liver injury is a significant leading cause of liver disease and post-market attrition of approved drugs. Hepatotoxicity is poorly predicted by preclinical animal studies, which can be explained by differences in drug metabolism between human and experimental species. Thus, several hepatic cell-based models have been used for early safety risk assessment during drug development. Cultured hepatocytes have contributed to increase knowledge of the metabolic patterns and mechanisms involved in drug toxicity. The sandwich culture model promotes polarized cell surface and stabilizes hepatocyte functionality, particularly transport systems, better than monolayer cultures. In addition to hepatocytes, other cell-based models have been proposed for hepatotoxicity studies. Hepatoma cell lines are metabolically poor compared to hepatocytes, but offer key advantages which make them useful for screening purposes. Alternatively, hepatic cell lines engineered for stable or transient expression of key drug-metabolizing enzymes have also been used. Finally, hepatocytes derived from both embryonic (ES) and induced (iPS) pluripotent stem cells are emerging cell models that will provide a stable and unlimited source of hepatocytes. As 3D spatial organization and complex heterotypic cell interactions are essential for the functional homeostasis of the liver, hepatocyte models (3D cultures, co-cultures with NPCs and microfluidic devices) that mimic cell-cell, cell-matrix interactions and nutrient flow characteristic of the liver microenvironment have been shown to improve the metabolic competency of hepatocytes and seem highly promising for preclinical toxicological studies of drugs.

**RESUMEN:** El daño hepático causado por fármacos es una de las causas principales de disfunción hepática, de muerte por fallo hepático agudo y de retirada del mercado de fármacos ya autorizados. Los estudios preclínicos en animales con frecuencia son poco predictivos de la hepatotoxicidad en el hombre, debido a las diferencias del metabolismo hepático entre especies. Por ello, se ha potenciado el uso de modelos celulares hepáticos de origen humano para la evaluación temprana de la seguridad de los fármacos durante el desarrollo. Los estudios con hepatocitos cultivados han contribuido al conocimiento de los mecanismos implicados en la toxicidad por fármacos. Los hepatocitos cultivados en doble capa de colágeno mantienen la polaridad y los sistemas de transporte, así como una estabilización funcional más prolongada. Otras células hepáticas han sido propuestas como alternativa a los hepatocitos para evaluar la hepatotoxicidad. Si bien las líneas celulares de hepatomas humanos tienen menor capacidad metabólica que los hepatocitos, presentan ventajas clave para el cribado de fármacos. Las células manipuladas genéticamente con expresión estable o transitoria de enzimas de biotransformación son muy útiles para estudios de metabolismo y toxicidad. Por último, los hepatocitos derivados de células madre pluripotentes tanto embrionarias (ES) como inducidas (iPS) son modelos celulares emergentes que proporcionarán una fuente estable e ilimitada de hepatocitos. La organización espacial tridimensional (3D) y las interacciones celulares heterotípicas son esenciales para la homeostasis funcional del hígado. Por ello, los modelos hepáticos (cultivos 3D, co-cultivos con CNPs y dispositivos microfluídicos) que reproducen las interacciones célula-célula, célula-biomatriz y el microflujo de nutrientes y oxígeno característicos del microentorno hepático mejoran la competencia metabólica de los hepatocitos y son muy prometedores para los estudios preclínicos de la hepatotoxicidad de fármacos.

**Corresponding Author:** gomez\_mjo@gva.es

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 2 (2017), pp. 255-267

## 1. INTRODUCCIÓN

El hecho de que el hígado sea el órgano más activo en el metabolismo de los fármacos lo convierte en una diana muy vulnerable. De hecho, la hepatitis tóxica constituye el 14 % de los casos de lesión hepática que ingresan en un hospital y son una de las causas principales de fallo hepático agudo requiriendo con frecuencia un trasplante

hepático (1,2). Además, la hepatotoxicidad supone la causa principal de la interrupción del desarrollo preclínico y clínico de nuevos medicamentos, así como de la retirada del mercado o de restricción de las indicaciones de fármacos ya aprobados (3). Si bien no existen datos concluyentes sobre la incidencia de la hepatotoxicidad, parece que tiende a aumentar coincidiendo con el número

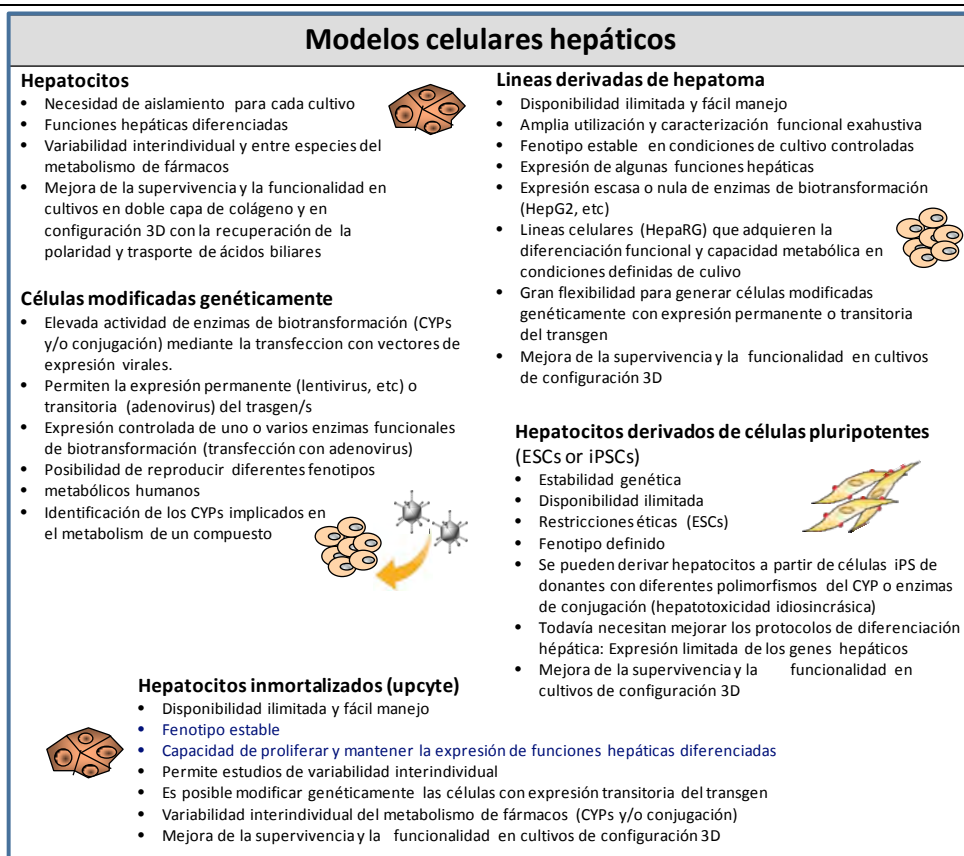
de fármacos comercializados y la situación se hace mucho más compleja con la polimedicación y el acceso no controlado a medicamentos y a otros compuestos. Debido a la dificultad de establecer un diagnóstico inequívoco, ya que no existen marcadores específicos que permitan discriminar la hepatotoxicidad de otras hepatopatías, la identificación de la naturaleza y el agente causal de la hepatotoxicidad es un reto clínico cada vez más relevante.

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo y costoso cuyo objeto es investigar si reúne los requisitos de eficacia terapéutica y seguridad exigidos para su administración al ser humano. El proceso completo incluye varias etapas, desde la identificación de la diana terapéutica y los estudios preclínicos hasta los ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, solo el 10 % de los fármacos que llegan a las fases de ensayo clínico mostrando eficacia y seguridad, se comercializan (3). Por ello, la detección temprana de los posibles efectos adversos durante el desarrollo de un nuevo fármaco, así como conocer los mecanismos implicados constituye un reto para la industria farmacéutica con gran relevancia tanto a nivel clínico como económico. Los estudios preclínicos de evaluación del riesgo tóxico se realizan habitualmente en animales de experimentación pero con frecuencia los resultados no son siempre extrapolables al hombre, produciendo falsos negativos y positivos. Ello es debido a las grandes diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en el metabolismo de fármacos entre el hombre y los animales (4,5). Dichas diferencias explican por qué pueden existir moléculas que, no habiendo sido tóxicas para los animales durante los estudios preclínicos, resultan serlo para el hombre al llegar a las fases clínicas del desarrollo. Todo ello indica que los estudios preclínicos convencionales no son siempre capaces de predecir los efectos adversos de un nuevo compuesto para

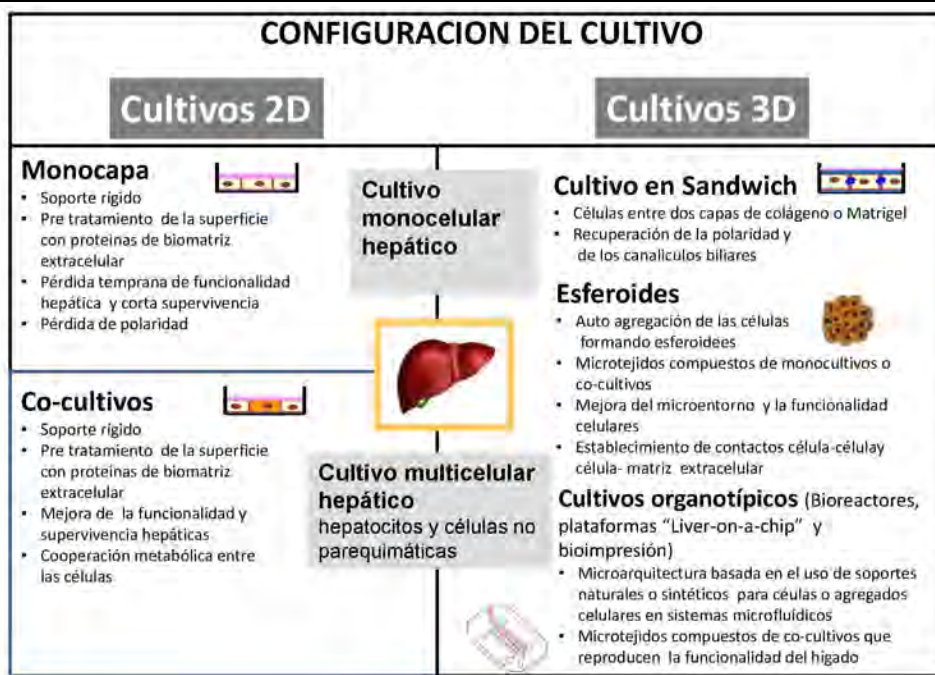
el hombre. En las últimas décadas, la baja correlación entre los datos experimentales en animales y humanos y los cambios legislativos en la UE han convertido los modelos celulares hepáticos humanos en una alternativa indispensable a la experimentación animal para una evaluación temprana de la seguridad de fármacos (12-15). Su utilización contribuye sin lugar a dudas a mejorar el diseño de los estudios, a aumentar la seguridad en la futura administración clínica del fármaco, y son de gran ayuda para la toma de decisiones estratégicas con gran ahorro en tiempo y costo económico.

En este manuscrito se presentan diferentes modelos celulares hepáticos de origen humano desarrollados en los últimos años para predecir el metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos en el hombre en fases muy tempranas de su desarrollo. Los hepatocitos humanos son el modelo más próximo al hígado humano, pero su limitada disponibilidad y la pérdida temprana del fenotipo hepático ha potenciado el uso de modelos hepáticos alternativos, tales como las líneas celulares derivadas de hepatoma humano, células modificadas genéticamente que expresan enzimas de biotransformación y los hepatocitos derivados de células pluripotentes (**Figura 1**). La organización espacial tridimensional (3D) (interacciones celulares y con la matriz extracelular y microflujo de nutrientes) y la heterocelularidad (co-cultivos) de los modelos hepáticos emergentes, permite recrear la estructura y homeostasis funcional del hígado mostrando una mayor capacidad metabólica y funcional, así como una más prolongada supervivencia *in vitro* para estudios preclínicos de la hepatotoxicidad de nuevos fármacos (6-9) (**Figura 2**).





**Figura 1. Diferentes modelos celulares hepáticos para estudios de hepatotoxicidad.** Distintos modelos celulares hepáticos desarrollados en los últimos años para estudiar el metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos en el hombre en fases muy tempranas de su desarrollo. Los modelos incluyen desde líneas celulares hepáticas, células hepáticas modificadas genéticamente que expresan enzimas de biotransformación, cultivos de hepatocitos y los modelos emergentes de hepatocitos derivados de células pluripotentes.



**Figura 2. Configuración de los cultivos de células hepáticas: Modelos 2D y 3D.** En los últimos años se han desarrollado nuevos modelos capaces de reproducir la heterocelularidad del hígado, la organización espacial tridimensional, la micro-arquitectura y la circulación de fluidos esenciales para la homeostasis funcional del hígado.

## 2. HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR FÁRMACOS

La mayor parte de las sustancias que pueden actuar como hepatotoxinas lo son por razones intrínsecas, dosis-dependientes y fácilmente identificables, y su toxicidad es reproducible en animales (p.ej. paracetamol). Sin embargo, hay un significativo número de fármacos cuya hepatotoxicidad es idiosincrática, es decir ocurre de modo impredecible en un número reducido de individuos susceptibles, sin relación directa con la dosis administrada, con un período de latencia variable y no es reproducible en animales de experimentación. Por ello, no son detectadas casi nunca durante el desarrollo (p.ej. diclofenac, perhexilina). Su aparición obedece a la interacción de un conjunto de circunstancias relacionadas con factores genéticos o de otra índole asociados al individuo (polimorfismos genéticos, edad, sexo, etnia, patologías hepáticas, alcoholismo, estado nutricional, hepatopatía previa, embarazo, co-administración de otros fármacos, etc.). La hepatotoxicidad idiosincrática puede tener un origen inmunoalérgico, metabólico o inflamatorio. En ocasiones, algunos metabolitos reactivos forman aductos con proteínas celulares que pueden ser capaces de actuar como haptenos (p. ej. diclofenac, halotano, ácido tienílico) desencadenando una respuesta inmune adaptativa que finalmente produce daño hepático (10). Los polimorfismos genéticos del complejo enzimático citocromo P450 (CYP) y enzimas de conjugación de los fármacos, son la causa de la variabilidad individual en el metabolismo de los medicamentos que puede favorecer o producir reacciones de hepatotoxicidad (11). De hecho la variabilidad genética es el factor de riesgo más importante en la hepatotoxicidad idiosincrática de naturaleza metabólica, muy particularmente cuando se producen metabolitos reactivos. Por otra parte se propone la hipótesis del estrés inflamatorio, en donde las citocinas proinflamatorias liberadas tras un episodio inflamatorio actúan modulando la susceptibilidad de un individuo a ciertos fármacos y sus metabolitos precipitando reacciones hepatotóxicas (p. ej. isoniazida) (12). La hepatotoxicidad idiosincrática por su gravedad e imprevisibilidad tiene un notable interés y relevancia clínica ya que la prevalencia de las reacciones adversas hepáticas idiosincráticas se estima entre 1/10000 a 1/100000 exposiciones para la mayoría de los fármacos. En ella contribuyen diversos factores que pueden estar relacionados bien con el fármaco y su metabolismo o bien con el propio individuo. Por ello, ningún modelo animal disponible en la actualidad es capaz de reproducir los múltiples factores de susceptibilidad (genéticos y adquiridos) que determinan la hepatotoxicidad idiosincrática en el hombre.

Aunque lo más frecuente es que en el curso del metabolismo de los fármacos se produzcan metabolitos estables y no tóxicos, en algunos casos el fármaco sufre un proceso de bioactivación y se generan metabolitos reactivos que son capaces de inducir el daño hepático mediante diversos mecanismos moleculares (p.ej. troglitazona, diclofenac, flutamida) (13,14). La

bioactivación es un factor clave para la hepatotoxicidad idiosincrática de los fármacos que, aunque poco común, suele ser más severa que la intrínseca. Las interacciones entre fármacos pueden predisponer a la hepatotoxicidad, tanto por inducción de determinados isoenzimas del CYP al elevar su expresión génica, aumentando así la tasa de producción de metabolitos reactivos, como por inhibición de uno a varios CYPs. Por tanto estas interacciones pueden afectar la biotransformación hepática y como consecuencia disminuir o aumentar la acción terapéutica de un medicamento o causar efectos secundarios indeseados. Diversos mecanismos moleculares pueden estar implicados en la hepatotoxicidad inducida por el fármaco o sus metabolitos que producen un amplio abanico de manifestaciones bioquímicas a nivel celular y síntomas clínicos que abarcan desde elevaciones clínicamente asintomáticas y transitorias de niveles séricos de enzimas hepáticas, hasta la disfunción hepática o el fallo hepático agudo (10, 15).

## 3. MODELOS CELULARES DE HEPATOCITOS EN CONFIGURACIÓN 2D

### 3.1. Cultivo de hepatocitos en monocapa

Los hepatocitos humanos son, sin lugar a dudas, el modelo más próximo al hígado humano. Durante décadas se han considerado el modelo *patrón oro* para estudios del metabolismo y toxicidad *in vitro*, y el modelo ideal para investigar las diferencias interindividuales en el metabolismo de los fármacos (6,15,16-18). Los cultivos en monocapa son aquellos en los que los hepatocitos se siembran sobre un soporte rígido, generalmente plástico, recubierto de proteínas de la matriz extracelular (MEC) (colágeno, fibronectina o Matrigel) (8), sobre el que adquieren una morfología aplanada que altera la conformación del citoesqueleto. Los hepatocitos humanos cultivados en monocapa muestran funciones hepáticas clave: metabolismo de carbohidratos (síntesis, degradación y acumulación de glucógeno, gluconeogenesis, glicolisis), ureogenesis, síntesis y secreción de proteínas plasmáticas, metabolismo lipídico, síntesis de ácidos biliares y biotransformación de xenobióticos (CYP y enzimas de conjugación) (8,16-18,20). Desafortunadamente, el acceso a muestras de tejido hepático humano es tan limitado, que hace su uso inaccesible para la evaluación rutinaria de nuevas moléculas. Los hepatocitos cultivados en monocapa poseen limitaciones como son la pérdida temprana de la expresión del fenotipo y funcionalidad hepática, en particular su capacidad para el metabolismo y transporte de fármacos y la falta de polaridad celular. Ello reduce considerablemente la sensibilidad para la detección de la hepatotoxicidad y no permiten reproducir los patrones de tratamiento de fármacos *in vivo*, como son exposiciones por tiempo prolongado en estudios crónicos con dosis repetidas (6-9, 19).

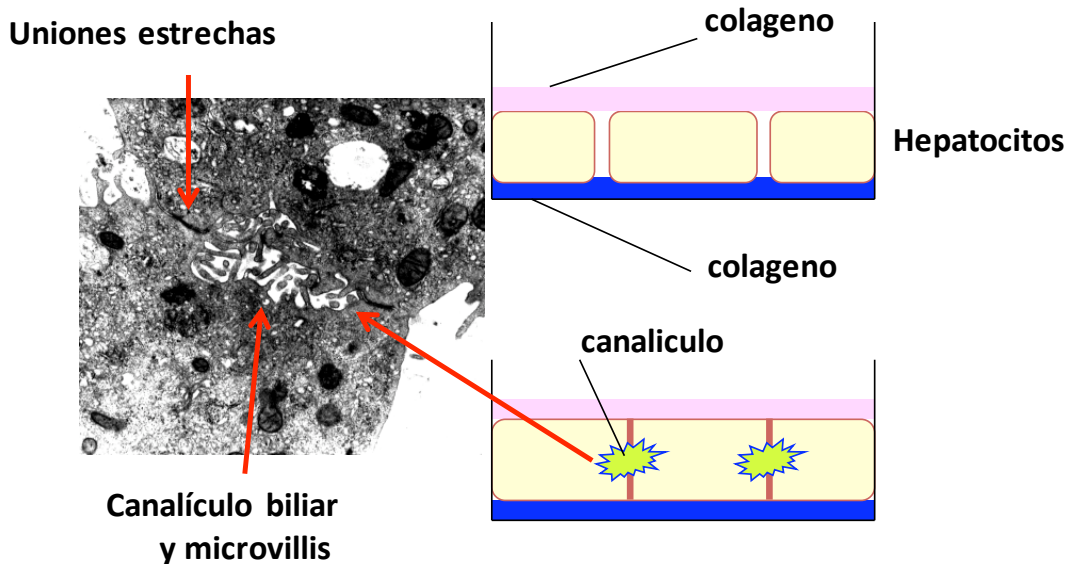
### 3.2. Hepatocitos cultivados en doble capa de colágeno

Este modelo se ha desarrollado con objeto de prolongar el mantenimiento de la funcionalidad hepática y en especial de recuperar la polaridad de los hepatocitos y el



transporte de ácidos biliares. La monocapa de hepatocitos se sitúa entre dos capas de MEC tradicionalmente colágeno o Matrigel (**Figura 3**). En estas condiciones los hepatocitos mantienen por periodos relativamente prolongados funciones hepáticas clave tales como la síntesis y secreción de albumina, la capacidad para el metabolismo y transporte de fármacos, la secreción de urea, la morfología poligonal similar a las células *in vivo*, etc. (8,9, 21). Hay que destacar que la mayor ventaja de este modelo es el mantenimiento de la polarización de la

membrana de los hepatocitos durante varios días de cultivo, con los dominios basolateral (sinusoidal) y apical (canalicular) que realizan respectivamente la captación y excreción de ácidos biliares funcionales, de tal modo que reproducen la secreción biliar *in vivo* (19). A pesar de todo, estudios genómicos y proteómicos indican la inestabilidad de la expresión de genes responsables de la funcionalidad hepática que también disminuye con el tiempo de cultivo (21).



**Figura 3. Hepatocitos cultivados en doble capa de colágeno.** La monocapa de hepatocitos se sitúa entre dos capas de MEC tradicionalmente colágeno o Matrigel. Recuperan la polaridad, la formación de canalículos biliares y el transporte de ácidos biliares.

#### 4. MODELOS CELULARES ALTERNATIVOS A LOS HEPATOCITOS HUMANOS

##### 4.1. Líneas celulares de hepatoma humano

Se han utilizado varias líneas celulares derivadas de tejido hepático humano tumoral (HepG2, Hep3B, Huh7, Fa2N4, HepaRG) para estudios de hepatotoxicidad. Una importante limitación de estas líneas celulares es que muestran, en general, una expresión muy limitada o inexistente de las isoenzimas relevantes para el metabolismo de fármacos en comparación con los hepatocitos y con el hígado humano. Aunque se utilizan ampliamente, su origen tumoral y su pertenencia a un solo genotipo, limita su representación de la amplia variación de la población humana. En cambio, presentan ventajas destacables (estabilidad fenotípica, reproducibilidad, elevada disponibilidad y fácil manejo) en comparación con los hepatocitos humanos que las hace atractivas para cribado de fármacos (22,23). Las líneas celulares más relevantes para estudios de toxicidad son HepG2 y HepaRG (22,23).

La línea de hepatoma humano HepG2 es la más utilizada y quizá por ello la mejor caracterizada funcionalmente. Se dispone de información muy exhaustiva sobre los efectos de un elevado número de compuestos (hepatotoxinas modelo, fármacos, compuestos

químicos) sobre muchos parámetros indicativos de toxicidad celular (viabilidad, integridad de la membrana, proliferación celular, niveles de ATP, estrés oxidativo, potencial de membrana mitocondrial, etc.) utilizando diferentes tecnologías (ensayos convencionales de toxicidad, metabolómica, transcriptómica y análisis de imagen de alto contenido) (24-29). Sin embargo, las predicciones de hepatotoxicidad basadas en estudios con células HepG2 son con frecuencia imprecisas ya que subestiman el efecto de metabolitos reactivos que *in vivo* se producen por bioactivación o sobre-estiman el efecto de fármacos con metabolismo rápido *in vivo*. Se han descrito ciertas mejoras de la funcionalidad de estas células utilizando diferentes tipos de cultivos 3D (microencapsulación, esferoides o sistemas microfluidicos) (15, 30,31).

Las células HepaRG se consideran actualmente el hepatoma humano más prometedor para estudios de hepatotoxicidad *in vitro* (22,23, 26, 32). Son células que en estado proliferativo no expresan el fenotipo hepático pero muestran marcadores de células progenitoras hepáticas bipotentes y son capaces de diferenciarse en condiciones adecuadas a hepatocitos o colangiocitos (33). Cuando, tras varias semanas en cultivo, alcanzan la confluencia, se puede inducir la diferenciación a hepatocitos en presencia

de DMSO mostrando la expresión de enzimas de biotransformación y de transportadores de ácidos biliares, así como la formación de canalículos biliares durante varias semanas ofreciendo la posibilidad de tratamientos prolongados con dosis repetidas (33-35). Se ha observado que el cultivo en diferentes sistemas 3D acelera el proceso de diferenciación a fenotipo hepático de estas células y mejora su capacidad funcional (36)

#### 4.2. Líneas celulares modificadas genéticamente

Una causa frecuente de la hepatotoxicidad inducida por fármacos es la bioactivación y la formación de metabolitos reactivos por los hepatocitos. Es por ello importante la detección de estos compuestos en fases muy tempranas del desarrollo pre-clínico, pero la identificación de moléculas bioactivables requiere el uso de modelos celulares con capacidad para biotransformar los fármacos y generar los metabolitos reactivos. Por tanto una alternativa muy útil para estos estudios es el uso de células manipuladas genéticamente que expresan los enzimas humanos de biotransformación (fundamentalmente los CYPs y de conjugación) con niveles similares al hígado (8,23). Se han utilizado diferentes estrategias para conferir capacidad metabólica a las líneas de hepatoma humano mediante la utilización de vectores de expresión (vaccinia virus, adenovirus, cytomegalovirus y retrovirus) que codifican por CYPs y enzimas de conjugación humanos resultando en la expresión constitutiva y estable o transitoria de los transgenes (8,23).

Existen líneas celulares derivadas de las células epiteliales humanas (THLE) y de las células HepG2 que expresan individualmente cada uno de los isoenzimas del CYP de forma constitutiva (8,23,37). Estos modelos generalmente sobre-expresan el transgen y son muy útiles para identificar el papel de los CYPs individuales en el metabolismo (bioactivación o inactivación) de un fármaco, así como para identificar los CYPs implicadas en la producción de cada uno de los metabolitos (8,23).

Alternativamente, la transducción mediada por adenovirus es un procedimiento simple, versátil y altamente reproducible para administrar eficazmente múltiples genes en células cultivadas y para obtener células que coexpresan los niveles deseados de varias enzimas de biotransformación (CYPs y enzimas de fase II) de fármacos. La estrategia se basa en la transducción de células HepG2 con combinaciones adecuadas de vectores adenovirales recombinantes que codifican estas enzimas para generar una variedad de células “a la carta” que reproducen fenotipos metabólicos de interés para el metabolismo y hepatotoxicidad de fármacos (38-40). Por ejemplo, con el uso combinado de varios adenovirus que codifican CYPs individuales y la información del fenotipo metabolizador de un paciente que haya sufrido un episodio hepatotóxico es posible crear una célula hepática que reproduzca dicho fenotipo y simule la idiosincrasia

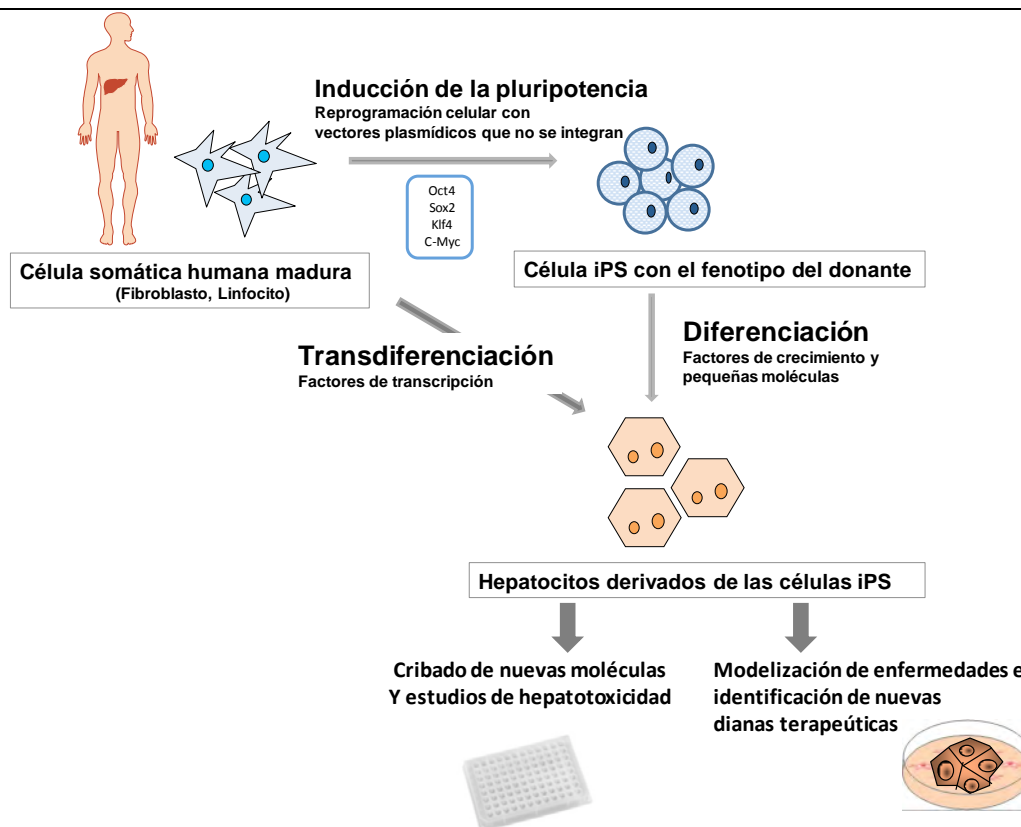
metabólica de dicho paciente, para poder estudiar los mecanismos de toxicidad implicados. La versatilidad de este modelo abre también la posibilidad de explorar el papel de enzimas hepáticos con elevada variabilidad interindividual (polimorfismo genético o fenotípico debido a inhibición/inducción enzimática por fármacos, edad, alimentación, etc.) en la bioactivación de los fármacos o evaluar comparativamente la susceptibilidad de diferentes grupos de población (metabolizadores rápidos o lentos) a la toxicidad inducida por los fármacos o identificar fenotipos de riesgo para la toxicidad del fármaco(s). Sin embargo, una limitación importante es que la expresión del transgen es transitoria y hay que realizar una nueva transfección adenoviral para cada experimento.

#### 4.3. Hepatocitos derivados de células madre pluripotentes

Una solución emergente para contrarrestar la escasez de los hepatocitos humanos para fines de investigación y clínicos es el uso de células progenitoras pluripotentes y que pueden diferenciarse a células de linaje hepático (**Figura 4**) (41). El conocimiento en torno a la reprogramación de células somáticas a pluripotentes y al tiempo la posibilidad de inducir *in vitro* su diferenciación a células de linaje hepático las convierte en un modelo celular muy atractivo para estudios de seguridad de fármacos. Por ello, actualmente se contemplan los modelos emergentes basados en hepatocitos derivados de células pluripotentes humanas como una fuente ilimitada, estable, funcional y personalizada de hepatocitos humanos alternativa a los hepatocitos nativos. Finalmente, se ha conseguido la reprogramación directa a células de fenotipo hepático desde una célula somática mediante la expresión retroviral de ciertos factores de transcripción hepáticos (Hhex, Gata4, Foxa2, HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  y HNF6) (42) (**Figura 4**).

#### 4.4. Células madre pluripotentes embrionarias (ES)

Se obtienen de la masa celular interna del blastocisto constituida por unas 30 células que son las células ES, que tienen la capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares que aparecen en el organismo adulto. Se han desarrollado protocolos para aislar estas células e inducir su diferenciación a células de linaje hepático tratando de reproducir la embriogénesis del hígado (41, 43). Actualmente, el Biobanco Nacional que dirige el Instituto de Salud Carlos III dispone de varias líneas de células ES generadas en España puestas a disposición de la comunidad científica. Sin embargo, existe gran variabilidad en la funcionalidad y metabolismo hepáticos en diferentes laboratorios por lo que hace todavía prematura la utilización de estas células para estudios de toxicidad. Se ha propuesto el cultivo en 3D de estas células con objeto de estabilizarlas para su uso en estudios de toxicidad (44).



**Figura 4. Hepatocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas.** Las células somáticas se transdiferencian directamente a linaje hepático mediante la expresión de ciertos factores de transcripción hepáticos (Hhex, Gata4, Foxa2, HNF4α HNF1α y HNF6) o se pueden reprogramar a pluripotencia (células iPS) y después diferenciarse a hepatocitos mediante protocolos de diferenciación definidos que tratan de reproducir la embriogénesis del hígado.

#### 4.5. Células madre pluripotentes inducidas (iPS)

La reprogramación de una célula somática diferenciada a una célula pluripotente, que se asemeja a una célula madre embrionaria, es uno de los avances más impactantes en el campo de la biología celular en la última década. Las células iPS son un tipo de células madre derivadas artificialmente a partir de células somáticas en las que se induce la expresión de varios genes exógenos (Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4), conocidos como factores de Yamanaka (**Figura 4**) (45), capaces de reprogramarlas al estado de pluripotencia. Las células iPS tienen propiedades similares a las células ES, incluyendo la pluripotencia y la autorenovación y pueden dar lugar a cualquier tipo de célula adulta como los hepatocitos. Se están desarrollando protocolos de diferenciación hepática de las células iPS y si bien el grado de funcionalidad hepática conseguido es todavía menor que el de los hepatocitos primarios, se van consiguiendo importantes mejoras de los protocolos para obtener hepatocitos de funcionalidad cada vez más robusta incluyendo la metabolización de fármacos (46-48). Sin embargo, como ocurre con todos los modelos celulares hepáticos los cultivos de células iPS en esferoides o en soportes 3D con materiales biocompatibles muestran una mejor y más consistente evolución hacia hepatocitos maduros (44, 49). Hay que destacar que estas células pueden ser una fuente ilimitada de hepatocitos de

diferentes individuos con variabilidad mínima entre lotes lo que favorece la reproducibilidad y el estudio de la toxicidad específica para un individuo. Por otra parte, disponer de un modelo celular que mimetice las características fenotípicas de los hepatocitos de un determinado paciente que haya sufrido un episodio de hepatotoxicidad por fármacos, sería clave para entender el fenómeno de la hepatotoxicidad idiosincrásica y con ello desarrollar herramientas diagnósticas más específicas y precisas soslayando la barrera clínica y ética. Además, la generación de paneles de células iPS que reflejen la diversidad de los perfiles de expresión de los CYPs en la población humana permitirá realizar estudios de metabolismo humano e interacciones fármaco-fármaco (46, 50).

#### 4.6. Hepatocitos humanos immortalizados

Recientemente se ha desarrollado una tecnología denominada Upcyte basada en la modificación genética de hepatocitos en cultivo primario para que adquieran la capacidad de proliferar y mantener al mismo tiempo la diferenciación hepática (51,52). Este modelo ofrece la ventaja de combinar la expresión de las características del fenotipo hepático de hepatocitos de donantes diferentes con una disponibilidad casi ilimitada y fácil manejo, similar a las líneas celulares de hepatomas humanos. El análisis a nivel transcriptómico de genes hepáticos muestra

un perfil de expresión próximo a los hepatocitos humanos (53). Así mismo las actividades basales de los CYPs y su respuesta a inductores enzimáticos son similares a la de los hepatocitos humanos en cultivo primario. También expresan los enzimas de conjugación y funciones hepáticas clave como la síntesis de urea, lípidos, glucógeno y proteínas plasmáticas, a niveles próximos a los hepatocitos (53). Se ha mostrado su utilidad para estudios preclínicos de hepatotoxicidad y metabolismo dada su capacidad biotransformadora y buena conservación del fenotipo hepático (53).

#### 4.7. Co-cultivos de hepatocitos con otras células

El hígado se compone de dos poblaciones celulares mayoritarias, las células parenquimáticas (hepatocitos) y células no parenquimáticas (CNP) que incluyen las células endoteliales sinusoidales, estrelladas y Kupffer. Las interacciones celulares entre los distintos tipos de células son esenciales para la homeostasis funcional del hígado y para modular el metabolismo de los xenobióticos (54). Además, como muchas respuestas tóxicas *in vivo* están mediadas por una compleja interacción entre los diferentes tipos de células del hígado, la capacidad predictiva de los hepatocitos en cultivo monotípico es frecuentemente limitada. En el hígado sano se requiere una interacción directa o una comunicación vía mediadores solubles entre las células Kupffer y los hepatocitos para que éstos mantengan su funcionalidad. Los co-cultivos con CNPs particularmente células de Kupffer permite la difusión de factores y citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, TGF- $\beta$ ) a los hepatocitos para poder estudiar la hepatotoxicidad de fármacos mediada por reacciones inflamatorias. Estas citocinas están involucradas en la toxicidad idiosincrática de ciertos fármacos como el trovafloxacin (55). Kostadinova y colaboradores (56) han mostrado que los co-cultivos 3D de hepatocitos y células estrelladas, Kupffer y endoteliales permiten estudiar el efecto de los fármacos con toxicidad idiosincrática con base inflamatoria. En otro estudio reciente se ha utilizado un co-cultivo 3D de hepatocitos y células de Kupffer para estudiar el efecto anti-inflamatorio de los glucocorticoides, y se observó una distribución de metabolitos similar al observado en la orina humana (57). Por tanto, se utiliza cada vez más el co-cultivo de hepatocitos con CNPs en cualquiera de los sistemas de cultivo utilizado tanto en monocapa como en configuración 3D, dada su implicación farmacológicas y toxicológicas tras la exposición a los fármacos. Los co-cultivos establecen interacciones entre células y muestran mayor supervivencia y capacidad metabólica y funcional mejorando la fiabilidad y la predicción *in vitro* del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos (6-8, 58, 59).

## 5. MODELOS CELULARES HEPÁTICOS EN CONFIGURACIÓN 3D

Como consecuencia de las limitaciones de los modelos hepatocelulares tradicionales para el estudio pre-clínico de la hepatotoxicidad de fármacos, se han desarrollado estrategias capaces de estabilizar el fenotipo hepático en

cultivo y conseguir modelos *in vitro* más predictivos. Actualmente existen ya nuevos modelos capaces de reproducir la heterocelularidad hepática, la organización espacial tridimensional, la micro-arquitectura y la microcirculación de fluidos, aspectos todos ellos esenciales para la homeostasis funcional del hígado. Se han desarrollado diferentes tipos de bioreactores y microtejidos en los que se trata de recrear las interacciones celulares y célula-biomatriz, así como el flujo de nutrientes característicos del microambiente hepático. Los sistemas 3D pueden consistir en la microencapsulación de las células en un soporte no rígido como el alginato o los hidrogeles no adhesivos, o en la formación de agregados celulares o esferoides sin ningún tipo de soporte (6,8). Otros sistemas 3D consisten en cultivar los hepatocitos en soportes sólidos formados por matrices porosas derivadas de materiales naturales (MEC de hígados decelularizados, colágeno, alginato, quitosan) (60) o sintéticos (polietilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poli (láctico-co-glicólico) y suelen incluir también sistemas microfluídicos (**Figura 2**) (36). Los soportes naturales ofrecen ventajas en términos de biocompatibilidad y reproducen las interacciones de las células con la MEC, en cambio los soportes sintéticos ofrecen reproducibilidad y estabilidad. Los modelos más sencillos se basan en el monocultivo de hepatocitos, pero la mayor parte de los sistemas 3D utilizan co-cultivos donde conviven los hepatocitos con otras células (15, 56). Asimismo, el cultivo de líneas celulares hepáticas en configuración 3D muestra cambios importantes en la expresión génica, el fenotipo y la expresión de los receptores celulares hacia propiedades más hepáticas. En general los modelos 3D presentan mayor supervivencia y mejoran su capacidad metabólica y funcional, permitiendo tratamientos prolongados con los fármacos y administración de dosis repetidas, por lo que actualmente representan los modelos de elección para mejorar la predicción *in vitro* del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos (6-9).

#### 5.1. Esferoides

Los hepatocitos en suspensión son capaces de autoagregarse, si se les impide la posibilidad de adherirse a un soporte sólido, restableciendo los contactos intercelulares para formar estructuras multicelulares 3D. El tamaño de los esferoides es crítico para evitar el riesgo de necrosis en su interior (200-300  $\mu\text{m}$ ) puesto que la difusión de oxígeno es un factor limitante (61). Los esferoides hepáticos tanto monotípicos como heterotípicos mantienen contactos intercelulares estables y duraderos lo que es clave para la preservación de la polaridad y el mantenimiento de la expresión y actividad de los enzimas de biotransformación y de marcadores específicos de funcionalidad hepática durante semanas (6, 62-64). Un estudio reciente muestra que los esferoides de co-cultivos de hepatocitos con CNPs constituye un sistema versátil y prometedor para estudiar patologías hepáticas (colestasis, esteatosis y hepatitis vírica) y hepatotoxicidad aguda y crónica de fármacos (64).

### 5.2. Dispositivos microfluidicos

La incorporación de canales microfluidicos, que regulan la microcirculación del medio nutritivo a los sistemas 3D, constituye un paso decisivo para controlar la difusión de oxígeno y nutrientes a las células a través del soporte compuesto por materiales biocompatibles sintéticos o naturales (6,9). Las uniones con la MEC acentúan la reorganización de los componentes del citoesqueleto celular para el anclaje, generan rutas inter e intracelulares específicas de segundos mensajeros y regulan la expresión génica a largo plazo (6). Por otra parte, los co-cultivos constituyen una mayor aproximación a la anatomía y fisiología hepáticas. Además, la combinación del co-cultivo de células hepáticas (hepatocitos/CNPs, células HepG2/C3A, HepaRG/células estrelladas), con la microcirculación y gradiente de difusión fisiológico de fármacos, oxígeno, nutrientes y residuos, ha permitido desarrollar diversas plataformas hepáticas. Estas plataformas reproducen la complejidad de la arquitectura y la zonación de los sinusoides hepáticos que son funcionales y estables durante varias semanas para estudios toxicológicos y clínicos (9, 65,66). Una ventaja decisiva de estos sistemas es la posibilidad de diseñar y ajustar la velocidad del flujo así como las concentraciones de los fármacos en el medio y reproducir diferentes situaciones fisiológicas en sangre tales como los estados de ayuno, postprandial o el ciclo circadiano de las hormonas (67-70).

### 5.3. Plataformas liver-on-a-chip

La complejidad del hígado se ha reducido a la simplicidad de dispositivos que recrean a microescala las funciones del hígado durante varios días (71). Tosh y colaboradores (72) han desarrollado un biochip hepático conocido como Hepa Tox Chip con canales microfluidicos compartimentalizados por donde circula el medio de cultivo que perfunde las células inmovilizadas en colágeno. El futuro nos reserva otras plataformas de mayor complejidad y potencial, como la bioimpresión de tejidos y órganos donde confluyen las técnicas de impresión 3D, la biología celular y molecular (73). Se están desarrollando equipos que depositan células y nutrientes sobre estructuras sencillas en archivos numéricos que emplean materiales biocompatibles que actúan como soportes o armazones para su colonización por células, generando una estructura que realiza las funciones fisiológicas del hígado. El soporte podría ser biodegradable para que pudiera ser sustituido por células gradualmente hasta desaparecer una vez cumplida su función de soporte. La bioimpresión de tejido hepático se puede realizar en diferente formato como placas de cultivo o chips. Sin embargo, esta tecnología todavía se enfrenta a varios retos. Aunque es posible cultivar hepatocitos diferenciados, el problema es que éstos no se dividen y, por tanto, es muy limitada la

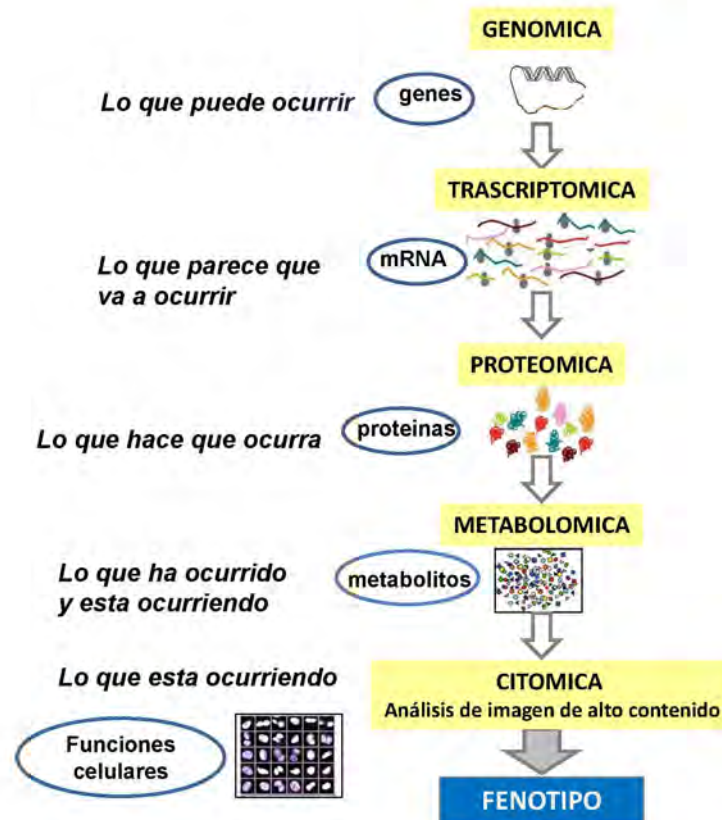
posibilidad de colonizar estructuras de gran tamaño. La solución para el futuro consistiría en emplear hepatocitos derivados de células madre iPS (74). Por tanto, la bioimpresión 3D es una tecnología emergente muy prometedora que se aproxima a la composición real del hígado incluyendo los tipos celulares relevantes y su arquitectura.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los recientes avances en el desarrollo de modelos hepáticos experimentales unido a las nuevas tecnologías ómicas abren nuevas y prometedoras perspectivas para estudios de toxicidad pre-clínica en las fases iniciales del descubrimiento de fármacos. Se han diseñado estrategias para recrear *in vitro* el microentorno *in vivo* de las células hepáticas (características mecánicas, microcirculación, difusión de oxígeno y nutrientes, interacción célula-célula y célula-biomatriz extracelular) con la finalidad de mejorar y prolongar la funcionalidad hepática. En este contexto, los cultivos 3D y los diseños microfluidicos unidos a los co-cultivos de hepatocitos con otros tipos celulares son muy prometedores para predecir de forma fiable el metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos en el hombre (6,8,23, 29, 75).

La identificación de pacientes con una mayor predisposición a la hepatotoxicidad por un determinado fármaco, es un problema pendiente de solución, como lo es explicar el caso clínico concreto de daño hepático en un paciente por un determinado fármaco. Los modelos animales no son capaces de reproducir el fenómeno de hepatotoxicidad idiosincrásica y por tanto no nos permiten anticipar su riesgo en el hombre. Por tanto, la posibilidad de generar modelos hepáticos con expresión "*a la carta*" de los enzimas de biotransformación es una estrategia innovadora para predecir fenotipos metabólicos de riesgo y para estudios de idiosincrasia metabólica. Los hepatocitos derivados de células pluripotentes humanas son modelos emergentes que pueden proporcionar una fuente ilimitada, estable y personalizada de hepatocitos derivados de pacientes singulares para estudios de toxicidad idiosincrásica.

Finalmente, la integración de las tecnologías ómicas y el desarrollo de estrategias multiparamétricas permitirán identificar biomarcadores y biofirmas predictivas de los mecanismos de hepatotoxicidad de fármacos y su traslación a la clínica (**Figura 5**) (25, 39, 26). La genómica, transcriptómica, proteómica y las más reciente metabolómica y citómica constituyen nuevas y eficaces aproximaciones tecnológicas para realizar estudios toxicológicos mecanísticos (76). Actualmente no hay ninguna duda de que la toxicología *in vitro* es un área muy prometedora para abordar estudios mecanísticos considerados clave hoy día para evaluar adecuadamente el riesgo de toxicidad de fármacos.



**Figura 5. Cascada de las ómicas.** Incorpora complejos conjuntos de datos que describen la respuesta de los sistemas biológicos a la toxicidad y a las perturbaciones genéticas y medioambientales de los distintos niveles ómicos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003;349:474-485.
2. Kongkaew C, Noyce PR, Ashcroft DM. Hospital admissions associated with adverse drug reactions: a systematic review of prospective observational studies. *Ann Pharmacother*. 2008; 42:1017-1025.
3. Bunnage ME. Getting pharmaceutical R&D back on target. *Nat Chem Biol*. 2011; 7:335-339.
4. Lewis DF, Ioannides C, Parke DV. Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Environ Health Perspect* 1998; 106:633-641.
5. O'Brien PJ, Chan K, Silber PM. Human and animal hepatocytes in vitro with extrapolation in vivo. *Chem Biol Interact* 2004; 150:97-114.
6. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 2013; 87:1315-1530.
7. Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, et al. Models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)* 2013; 2:23-39.
8. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Conde I, Donato MT. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014; 10:1553-1568.
9. Lauschke VM, Hendriks DF, Bell CC, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Novel 3D Culture Systems for Studies of Human Liver Function and Assessments of the Hepatotoxicity of Drugs and Drug Candidates. *Chem Res Toxicol*. 2016; 29:1936-1955.
10. Björnsson ES. Hepatotoxicity by Drugs: The Most Common Implicated Agents. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:224.
11. Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, et al. Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 2014; 109:950-966.
12. Shaw PJ, Ganey PE, Roth RA. Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2010; 118:7-18.



13. Park BK, Laverty H, Srivastava A, et al. Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity. *Chem Biol Interact* 2011; 192:30-36
14. Sakatis MZ, Reese MJ, Harrell AW, et al. Preclinical strategy to reduce clinical hepatotoxicity using in vitro bioactivation data for >200 compounds. *Chem Res Toxicol* 2012; 25:2067-2082
15. Gomez-Lechon MJ, Tolosa L, Castell JV, et al. Mechanism-based selection of compounds for the development of innovative in vitro approaches to hepatotoxicity studies in the LIINTOP project. *Toxicol In Vitro* 2010; 24:1879-1889.
16. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, et al. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2003; 4:292-312.
17. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV et al. Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab* 2004; 5:443-462.
18. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT. An update on metabolism studies using human hepatocytes in primary culture. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4:837-854.
19. Hewitt NJ, Gómez-Lechon MJ, Houston JB, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 2007; 39:159-234.
20. Kim HM, Han SB, Hyun BH, et al. Functional human hepatocytes: isolation from small liver biopsy samples and primary cultivation with liver-specific functions. *J Toxicol Sci* 1995; 20:565-578.
21. Kienhuis AS, Wortelboer HM, Maas WJ, et al. A sandwich-cultured rat hepatocyte system with increased metabolic competence evaluated by gene expression profiling. *Toxicol In Vitro* 2007; 21:892-901.
22. Donato MT, Lahoz A, Castell JV, et al. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab* 2008; 9:1-11.
23. Donato MT, Jover R, Gomez-Lechon MJ. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr Drug Metab* 2013; 14:946-968.
24. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, et al.: High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol* 2006; 80:580-604.
25. Tolosa L., Pinto S, Donato MT, et al. Development of a Multiparametric Cell-based Protocol to Screen and Classify the Hepatotoxicity Potential of Drugs. *Toxicol Sci* 2012a; 127:187-198.
26. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Donato MT. High-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in cell models. *Arch Toxicol* 2015a; 89:1007-1022.
27. Tolosa L, Carmona A, Castell JV, et al. High-content screening of drug-induced mitochondrial impairment in hepatic cells: effects of statins. *Arch Toxicol* 2015b; 89:1847-1860.
28. Van den Hof WF, Coonen ML, van Herwijnen M, et al. Classification of hepatotoxicants using HepG2 cells: A proof of principle study. *Chem Res Toxicol* 2014; 27:433-442.
29. Donato MT, Gómez-Lechón MJ, Tolosa L. Using high-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in preclinical studies. *Expert Opin Drug Discov* 2017; 12:201-211.
30. Nakamura K, Kato N, Aizawa K, et al. Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. 2011;036:625633.
31. Ramaiahgari SC, den Braver MW, Herpers B, et al. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxicol* 2014; 88:1083-1095.
32. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Jiménez N, et al. Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016b; 1:02:1-9.
33. Aninat C, Piton A, Glaise D, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 2006; 34:75-83.
34. Klein S, Mueller D, Schevchenko V, Noor F. Long-term maintenance of HepaRG cells in serum-free conditions and application in a repeated dose study. *J Appl Toxicol* 2014; 34:1078-1086.
35. Le Vee M, Noel G, Jouan E, et al. Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol In Vitro* 2013; 27:1979-86.
36. Mueller D, Kramer L, Hoffmann E, et al. 3D organotypic HepaRG cultures as in vitro model for acute and repeated dose toxicity studies. *Toxicol In Vitro* 2014; 28:104-112.
37. Gustafsson F, Foster AJ, Sarda S, et al. A correlation between the in vitro drug toxicity of drugs to cell lines that express human P450s and their propensity to cause liver injury in humans. *Toxicol Sci* 2014; 137:189-211.
38. Tolosa L, Donato MT, Pérez-Cataldo G, et al. Upgrading cytochrome P450 activity in HepG2 cells co-transfected with adenoviral vectors for drug hepatotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro* 2012b; 26:1272-1277.
39. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Pérez-Cataldo G, et al. HepG2 cells simultaneously expressing five P450



- enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Arch Toxicol*. 2013; 87:1115-1127.
40. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Upgrading HepG2 cells with adenoviral vectors that encode drug-metabolizing enzymes: application for drug hepatotoxicity testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13:137-148.
  41. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L. Human hepatocytes derived from pluripotent stem cells: promising cell model for drug hepatotoxicity screening. *Arch Toxicol*. 2016; 90:2049-2061.
  42. Yu B, He ZY, You P, et al. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*. 2013;13:328-340.
  43. Baxter MA, Rowe C, Alder J, et al. Generating hepatic cell lineages from pluripotent stem cells for drug toxicity screening. *Stem Cell Res* 2010; 5:4-22.
  44. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* 2013; 34:1781-1789.
  45. Liu X, Huang J, Chen T, et al. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Res*. 2008;18:1177-1189.
  46. Medine CN, Lucendo-Villarin B, Storck C, et al.: Developing high-fidelity hepatotoxicity models from pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2:505-9.
  47. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010; 51:297-305.
  48. Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, et al. An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet* 2014; 29:237-243
  49. Gieseck RL, Hannan NR, Bort R, et al. Maturation of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes by 3D-culture. *PLoS One* 2014; 9:e86372.
  50. Anson BD, Kolaja KL, Kamp TJ. Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89:754-758.
  51. Burkard A, Dahn C, Heinz S, et al. Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte(R) technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica* 2012; 42:939-956.
  52. Levy G, Bomze D, Heinz S, et al. Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat Biotechnol*. 2015; 33:1264-1271
  53. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, López S, et al. Human Upcyte Hepatocytes: Characterization of the Hepatic Phenotype and Evaluation for Acute and Long-Term Hepatotoxicity Routine Testing. *Toxicol Sci*. 2016a; 152:214-229.
  54. Milosevic N, Schawalder H, Maier P. Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 1999; 26:75-87.
  55. Liguori MJ, Ditewig AC, Maddox JF, et al. Comparison of TNF $\alpha$  to lipopolysaccharide as an inflammagen to characterize the idiosyncratic hepatotoxicity potential of drugs: Trovafloxacin as an example. *Int J Mol Sci*. 2010; 11:4697-714.
  56. Kostadinova R, Boess F, Applegate D, et al. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 268:1-16.
  57. Sarkar U, Rivera-Burgos D, Large EM, et al. (2015) Metabolite profiling and pharmacokinetic evaluation of hydrocortisone in a perfused three-dimensional human liver bioreactor. *Drug Metab Dispos* 43(7):1091-1099
  58. Ohno M, Motojima K, Okano T, et al. Up-regulation of drug-metabolizing enzyme genes in layered co-culture of a human liver cell line and endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 2008; 14:1861-1869.
  59. Krause P, Saghatolislam F, Koenig S, Unthanet al. Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; 45:205-12.
  60. De Kock J, Ceelen L, De Spiegelaere W, et al. Simple and quick method for whole-liver decellularization: a novel in vitro three-dimensional bioengineering tool? *Arch Toxicol* 2011; 85:607-612.
  61. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 2008; 3:1172-1184.
  62. van Zijl F, Mikulits W. Hepatospheres: Three dimensional cell cultures resemble physiological conditions of the liver. *World J Hepatol* 2010; 2:1-7.
  63. Ohkura T, Ohta K, Nagao T, Kusumoto K, Koeda A, Ueda T, Jomura T, Ikeya T, Ozeki E, Wada K, Naitoh K, Inoue Y, Takahashi N, Iwai H, Arakawa H, Ogihara T. Evaluation of human hepatocytes cultured by three-dimensional spheroid systems for drug metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2014;29:373-378.
  64. Bell CC, Hendriks DF, Moro SM, et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci Rep* 2016; 6:25187.
  65. Mueller D, Heinzle E, Noor F. 3D Hepatic In Vitro Models as Tools for Toxicity Studies. *Current Tissue Eng* 2013; 2:78-89.

66. Bhise NS, Manoharan V, Massa S, et al. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication*. 2016; 8:014101.
67. Chao P, Maguire T, Novik E, et al. Evaluation of a microfluidic based cell culture platform with primary human hepatocytes for the prediction of hepatic clearance in human. *Biochem Pharmacol* 2009; 78:625-632.
68. Goral VN, Hsieh YC, Petzold ON, et al. Perfusion-based microfluidic device for three-dimensional dynamic primary human hepatocyte cell culture in the absence of biological or synthetic matrices or coagulants. *Lab Chip* 2010; 10:3380-3386.
69. Novik E, Maguire TJ, Chao P, et al. A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies. *Biochem Pharmacol* 2010; 79:1036-1044.
70. Bhushan A, Senutovitch N, Bale SS, et al. Towards a three-dimensional microfluidic liver platform for predicting drug efficacy and toxicity in humans. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4 Suppl 1:S16.
71. Toh Y-C, Lim T C, Tai D, et al. A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing. 2009; *Lab Chip* 9: 2026–2010.
72. Bavli D, Prill S, Ezra E, et al. Real-time monitoring of metabolic function in liver-on-chip microdevices tracks the dynamics of mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016; 113: E2231–E2240.
73. Zhu W, Ma X, Gou M, et al. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 40: 103–112.
74. Ma X, Qu X, Zhu W, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2016; 113: 2206–2211.
75. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Metabolic activation and drug-induced liver injury: in vitro approaches for the safety risk assessment of new drugs. *J Appl Toxicol.* 2016; 36(6):752-768.
76. Las Omicas: Genómica, proteómica, citómica y metabolómica. Nuevas Tecnologías para el desarrollo de Fármacos. María Cascales Angosto, M<sup>a</sup> José Gómez-Lechón y Enrique O'Connor, eds. Madrid: Instituto de España y Real Academia Nacional de Farmacia, Fundación José Casares Gil, 2005.

# Hepatotoxicidad idiosincrásica por fármacos: promesas y limitaciones de las estrategias *in vitro*

**Title in English:** *Drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity: Promises and limitations of in vitro Strategies*

M. Teresa Donato

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València; Unidad Mixta de Investigación en Hepatología Experimental UV-Fundación La Fe.

**ABSTRACT:** Idiosyncratic hepatotoxicity occurs unpredictably in a small group of susceptible individuals with no direct dose relationship. Although the mechanisms involved in these adverse drug reactions remain unclear, several hypotheses have been proposed to explain their idiosyncratic nature, including drug conversion into reactive metabolites (bioactivation), activation of the immune system, mitochondrial dysfunction or inflammatory stress. Safety studies conducted during drug development are clearly insufficient to predict idiosyncratic toxic damage. The current preclinical models (experimental animals and *in vitro*) are unable to reproduce the multiple genetic or acquired factors that influence the individual susceptibility, which makes it practically impossible to detect drugs with the capacity to induce idiosyncratic episodes. In recent years, a great effort has been made to develop new strategies capable of anticipating idiosyncratic liver damage induced by drugs and to identify those patients with an increased risk for hepatotoxicity. *In vitro* assays based on the use of cellular models that reflect individual idiosyncrasy, together with *omics* and multiparametric cellular analysis technologies, have reoriented the evaluation of the toxic effects induced by drugs and are postulated as tools with great projection to discriminate hepatotoxic potential of new drugs.

**RESUMEN:** La hepatotoxicidad idiosincrásica se presenta de forma impredecible en un grupo reducido de individuos susceptibles y sin relación directa con la dosis. Si bien los mecanismos implicados en estas reacciones adversas de los fármacos permanecen sin esclarecer, se han propuesto varias hipótesis para explicar su naturaleza idiosincrásica, entre las que se incluyen la conversión del fármaco en metabolitos reactivos (bioactivación), la activación del sistema inmune, la disfunción mitocondrial o el estrés inflamatorio. Los estudios de seguridad que se realizan durante el desarrollo de fármacos son insuficientes para predecir el daño tóxico de naturaleza idiosincrásica. Los actuales modelos preclínicos (animales de experimentación e *in vitro*) son incapaces de reproducir los múltiples factores genéticos o adquiridos que influyen sobre la susceptibilidad individual, lo que hace prácticamente imposible la detección de fármacos con capacidad de inducir episodios idiosincráticos. En los últimos años se viene realizado un gran esfuerzo dirigido a desarrollar nuevas estrategias capaces de anticipar el daño hepático idiosincrático inducido por fármacos e identificar aquellos pacientes que presentan mayor riesgo a la hepatotoxicidad. Los ensayos *in vitro* basados en el uso de modelos celulares que reflejen la idiosincrasia individual, junto con las tecnologías ómicas y de análisis celular multiparamétrico, han reorientado la forma de evaluar los efectos tóxicos de los fármacos y se postulan como herramientas con gran proyección para discriminar el potencial hepatotóxico de nuevos fármacos.

**Corresponding Author:** donato\_mte@gva.es

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 2 (2017), pp. 268-283

## 1. INTRODUCCIÓN

La hepatotoxicidad por fármacos es un problema de salud de importancia creciente y un motivo de preocupación para los clínicos, la industria farmacéutica y los organismos reguladores. El número de fármacos capaces de inducir daño hepático es sorprendentemente elevado con manifestaciones clínicas que abarcan desde formas leves con elevación asintomática de transaminasas en suero hasta hepatitis fulminantes (1-3). Esta especial vulnerabilidad del hígado a la acción tóxica de los fármacos puede justificarse en base a su localización anatómica entre la circulación portal y la sistémica, su papel clave en los procesos de biotransformación y la expresión elevada de transportadores de fármacos que pueden facilitar la acumulación de compuestos tóxicos en

los hepatocitos.

Los estudios de seguridad realizados durante el desarrollo de fármacos brindan una primera oportunidad para identificar y descartar moléculas con capacidad de inducir toxicidad en el hombre; no obstante, el daño hepático por fármacos es uno de los fenómenos tóxicos con menor correlación con los tests en animales por lo que con frecuencia no se detecta durante los ensayos preclínicos (4-5). La hepatotoxicidad constituye hoy en día la razón principal para la retirada del mercado de fármacos previamente aprobados y la interrupción del desarrollo de nuevos fármacos (6). La hepatotoxicidad inducida por algunos fármacos es intrínseca, lo que significa que sus efectos dependen de la dosis, se manifiesta de forma similar en todos los pacientes y es reproducible en modelos animales. La dificultad en la predicción es mucho

mayor para aquellos fármacos que inducen reacciones idiosincráticas, de tal forma que su hepatotoxicidad solo se manifiestan en una minoría de pacientes susceptibles y a dosis que son seguras para el resto de la población (1,7). Estos episodios raros de toxicidad no son predecibles en modelos experimentales por lo que en la práctica no se detectan antes de la aprobación del fármaco y solo emergen tras su autorización y comercialización, cuando miles de pacientes han sido expuestos al fármaco (6,7).

La hepatotoxicidad idiosincrática es particularmente insidiosa por su naturaleza impredecible y su potencial gravedad. En la actualidad son muchos los grupos de investigación básica, clínica y de la industria farmacéutica que están volcando sus esfuerzos para ahondar en el conocimiento de los mecanismos responsables de estas reacciones tóxicas de los fármacos y de los factores individuales que expliquen la mayor vulnerabilidad de ciertos pacientes. No cabe duda de que el desarrollo de estrategias experimentales capaces de anticipar el potencial de nuevas moléculas para inducir hepatotoxicidad idiosincrática contribuirá de forma indudable al desarrollo de fármacos más seguros.

## 2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA HEPATOTOXICIDAD IDIOSINCRÁTICA

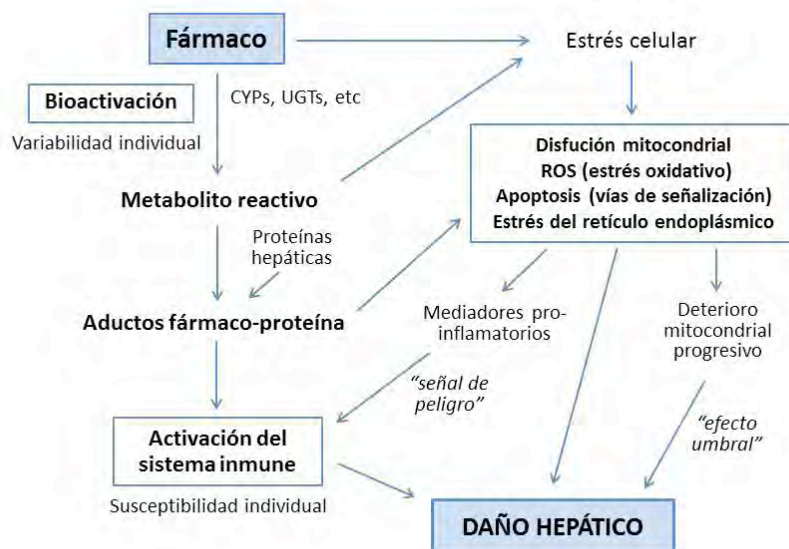
Diversos factores relacionados con el propio fármaco (*drug-dependent*) o con el individuo (*host-dependent*) pueden contribuir a la aparición de estas reacciones tóxicas singulares (**Figura 1**) (3,8). Los avances en el conocimiento mecanístico de la hepatotoxicidad idiosincrática se han visto dificultados por diversos motivos tales como su baja incidencia, que hace casi imposible su detección en el pequeño número de animales de laboratorio utilizados en las evaluaciones preclínicas de seguridad, las diferencias interespecies, la existencia de factores individuales de susceptibilidad y la falta de una relación consistente con la dosis (9). A pesar de estas limitaciones, los esfuerzos recientes encaminados al desarrollo de nuevos modelos animales y sistemas *in vitro* han contribuido a aumentar la comprensión molecular del daño hepático por fármacos de naturaleza idiosincrática (9,10).



**Figura 1. Factores de riesgo asociados a la hepatotoxicidad idiosincrática.**

Son varios los mecanismos que han sido implicados en la hepatotoxicidad idiosincrática inducida por fármacos y las hipótesis propuestas para explicar su aparición en sujetos susceptibles. Aunque los mecanismos subyacentes siguen siendo ampliamente desconocidos en muchos

casos, la bioactivación metabólica del fármaco, la respuesta inmune adaptativa, el daño mitocondrial y el estrés inflamatorio se consideran factores clave (9,11) (**Figura 2**).



**Figura 2. Mecanismos propuestos para explicar la hepatotoxicidad idiosincrática.** El metabolismo hepático de fármacos puede generar metabolitos reactivos (bioactivación) con capacidad para formar aductos con proteínas y activar la respuesta adaptativa del sistema inmune (haptización). La variabilidad interindividual en el metabolismo de fármacos y/o la respuesta del sistema inmune pueden explicar las diferencias en la susceptibilidad a la hepatotoxicidad por fármacos. Los fármacos, o con frecuencia sus metabolitos reactivos, interactúan con funciones o estructuras de los hepatocitos, induciendo estrés o daño celular a través de diferentes mecanismos. El daño progresivo sobre las mitocondrias o la liberación de señales proinflamatorias pueden contribuir también como factores adicionales para desencadenar la hepatotoxicidad. ER, retículo endoplásmico; ROS, especies reactivas del oxígeno.

Las reacciones del metabolismo de fármacos, y en particular las oxidaciones catalizadas por los citocromo P450 (CYP) hepáticos juegan un papel importante en la toxicidad idiosincrásica (8,12). Muchos fármacos son metabolizados activamente antes de ser eliminados de nuestro organismo y, en la mayoría de los casos, se generan metabolitos biológicamente inactivos. Sin embargo, dependiendo de la estructura química del compuesto, pueden formarse metabolitos más tóxicos que el fármaco original dando lugar a su bioactivación. La formación de metabolitos químicamente reactivos se ha asociado con el daño hepático inducido por muchos fármacos y se ha comprobado que una alta proporción de fármacos retirados o con restricciones de uso (*black box warnings*) por su hepatotoxicidad generan metabolitos reactivos (13).

Los metabolitos tóxicos formados durante el metabolismo de fármacos son químicamente diversos, e incluyen especies electrofílicas, radicales y especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos intermediarios reactivos pueden interactuar con estructuras o funciones celulares y causar toxicidad a través de diferentes mecanismos (14). La disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la alteración de la homeostasis del calcio intracelular o la modificación covalente de macromoléculas son algunos de los efectos inducidos por metabolitos reactivos.

En el ser humano existe una variabilidad interindividual muy significativa en los enzimas hepáticos de biotransformación que se traduce en diferencias no sólo en la velocidad de metabolización de los fármacos, sino también en los perfiles metabólicos resultantes. Dichas

diferencias son debidas a una combinación de factores genéticos (polimorfismos) o de otra índole (factores nutricionales o fisiológicos, patologías, procesos inflamatorios, consumo de fármacos, alcohol o tabaco, inducción enzimática, etc) que controlan la expresión y/o la actividad de enzimas del metabolismo de fármacos (15). Esta variabilidad fenotípica genera una idiosincrasia metabólica que puede contribuir a la aparición de reacciones tóxicas singulares. Los individuos susceptibles pueden mostrar un metabolismo característico de un fármaco en particular (p.e., aumento de la formación de metabolitos reactivos y/o disminución de su inactivación), lo que puede conducir a un mayor riesgo de hepatotoxicidad (16).

En algunos casos, los aductos covalentes formados por la interacción de metabolitos reactivos con proteínas hepáticas pueden actuar como haptenos y activar el sistema inmune ("hipótesis del hapteno") (17). Tras la haptización, las proteínas modificadas son procesadas y presentadas como antígenos para su reconocimiento por los linfocitos, poniendo así en marcha la respuesta inmunológica que culmina en daño hepático. La propensión de un fármaco para formar aductos depende de la proporción de metabolitos reactivos generados, su vida media y su capacidad para reaccionar con proteínas diana (14). Ahora bien, la formación de aductos se considera una condición necesaria, pero no suficiente, para desencadenar la respuesta inmune, en la que hay un componente idiosincrásico que determina el umbral de tolerancia de un individuo frente a los aductos formados. Las diferencias individuales en la propensión a desarrollar una respuesta inmune adaptativa pueden ser determinantes en el

resultado final (adaptación/tolerancia *versus* hepatotoxicidad) y podrían explicar por qué estas reacciones adversas al fármaco ocurren sólo en un pequeño grupo de pacientes susceptibles (3,17). En este sentido, se han establecido asociaciones interesantes entre ciertos haplotipos HLA y la mayor propensión al daño hepático inducido por determinados fármacos (17).

Se ha postulado que la generación de metabolitos reactivos y la posterior formación de aductos (haptización) son insuficientes para causar lesión hepática y, por lo tanto, se requiere una segunda señal ("señal de peligro") para precipitar la hepatotoxicidad. Las células estresadas o dañadas liberan moléculas (mediadores proinflamatorios, péptidos modificados) que pueden estimular/regular la activación linfocitaria mediada por las células presentadoras de antígenos. La disfunción mitocondrial inducida por el fármaco, la generación de ROS, el estrés del retículo endoplasmático, la activación de las vías de muerte celular, los episodios inflamatorios leves, las infecciones o las alteraciones de la microbiota han sido propuestas como posibles factores independientes que pueden actuar como coadyuvantes para modificar la respuesta inmune adaptativa (3,9,11). La necesidad de que la exposición a un fármaco que forma metabolitos reactivos con capacidad de unirse covalentemente a proteínas deba coincidir en el tiempo con una señal de activación o de peligro puede explicar la baja incidencia de la hepatotoxicidad idiosincrásica.

Una serie de características singulares de las mitocondrias (composición de su doble membrana, alta producción de ROS, síntesis de ATP, acumulación de moléculas pro-apoptóticas, vulnerabilidad del ADN mitocondrial, etc.) las convierten en una diana celular importante del daño inducido por fármacos (18). Su papel fundamental en la integración de vías de señalización y en la supervivencia y mantenimiento de la homeostasis de la célula las hacen acreedoras de un papel central en los mecanismos de hepatotoxicidad (18,19). Tras un insulto tóxico, no todas las mitocondrias de una célula son afectadas por igual, al tiempo que se desencadenan mecanismos compensatorios (mitofagia, biogénesis, fusión, fisión) para adaptar el metabolismo mitocondrial al estrés inducido por el fármaco (20). Se ha postulado que el daño mitocondrial acumulado en una célula puede no tener consecuencias directas hasta que se alcanza un umbral crítico, por encima del cual el daño a la célula se hace repentinamente evidente (19). Este "efecto umbral" puede contribuir a la idiosincrasia individual, ya que los pacientes susceptibles pueden mostrar una acumulación

más rápida de mitocondrias con función comprometida.

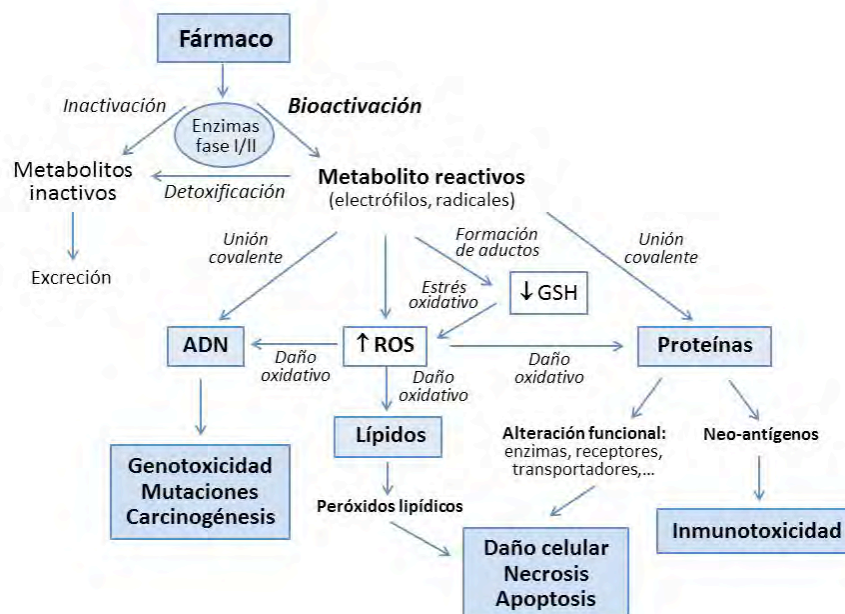
Evidencias obtenidas en estudios en modelos animales sugieren que la susceptibilidad de un individuo a ciertos fármacos puede estar modulada por episodios de inflamación concurrentes, cuya aparición esporádica y errática sería la base de la hepatotoxicidad idiosincrática ("hipótesis del estrés inflamatorio") (9,19). La liberación de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores durante un estrés inflamatorio moderado puede aumentar la sensibilidad de las células hepáticas, reducir el umbral de toxicidad del fármaco y precipitar una reacción hepatotóxica. Al mismo tiempo, un fármaco podría exacerbar la respuesta a una situación inflamatoria leve e inofensiva y convertirla en perjudicial (9).

En resumen, son varias las hipótesis mecanísticas propuestas para explicar la naturaleza idiosincrática de la hepatotoxicidad inducida por algunos fármacos. Cada hipótesis se apoya en evidencias clínicas y experimentales, y ninguna ha sido definitivamente probada. Los diferentes mecanismos son compatibles y no mutuamente excluyentes, incluso para un fármaco en particular. La hepatotoxicidad idiosincrásica puede surgir de la concurrencia de múltiples factores o mecanismos que, cuando se producen individualmente, no inducen toxicidad manifiesta pero que de forma combinada pueden desencadenar una lesión hepática (**Figura 2**). Este escenario se resume en la "hipótesis de múltiples determinantes", que establece que las reacciones idiosincrásicas requieren la aparición simultánea de varios factores discretos y precipitantes (9).

### **3. METABOLISMO DE FÁRMACOS, BIOACTIVACIÓN Y HEPATOTOXICIDAD IDIOSINCRÁTICA**

La biotransformación de fármacos comprende reacciones de oxidación, reducción o de hidrólisis que introducen o exhiben nuevos grupos polares en la molécula (fase I) y reacciones de conjugación con cofactores endógenos hidrófilos (fase II) para formar metabolitos solubles en agua que se excretan fácilmente. Se han descrito relaciones estrechas entre el metabolismo del fármaco y acontecimientos hepáticos adversos (**Figura 3**). Un estudio sistemático con unos 200 fármacos ampliamente prescritos en EEUU reveló que los fármacos sin metabolismo hepático significativo raramente causan daño hepático, mientras que se encontró un riesgo aumentado para los fármacos con un metabolismo hepático superior al 50 % (21).





**Figura 3. Papel de la bioactivación en la hepatotoxicidad por fármacos.** Durante el metabolismo de fármacos se pueden formar metabolitos estables/inactivos y metabolitos reactivos. La bioactivación metabólica puede dar lugar a hepatotoxicidad por la reacción de metabolitos electrofílicos del fármaco con centros nucleofílicos de macromoléculas (ADN, lípidos, proteínas) o por el daño oxidativo inducido por un exceso de formación de ROS.

La bioactivación del fármaco suele estar relacionada con reacciones de fase I, en particular con oxidaciones mediadas por los CYPs. El CYP3A4, el más abundante en el hígado humano y principal responsable del metabolismo oxidativo de los fármacos, explica la activación metabólica de muchos de ellos (22). Otros CYPs (por ejemplo, CYP2C9, 2C19, 1A2, 2B6, 2D6 o 2E1), otras enzimas de fase I (por ejemplo, flavina monooxigenasa, monoaminoxidasa o peroxidasas) o enzimas de fase II (por ejemplo, UDP-glucuronosiltransferasas) también están implicados activamente en la bioactivación de fármacos y otros xenobióticos (23,24).

Son varios los metabolitos electrofílicos que han sido implicados en la toxicidad producida por fármacos: quinona iminas (relacionados con la toxicidad de paracetamol, diclofenaco, amodiaquina, nefazodona), hidracinas (isoniazida, hidralazina), epóxidos (furosemida), carbonilos insaturados (por ejemplo, felbamato, terbinafina) o acilglucurónidos (diclofenaco y otros AINEs) entre otros (23,24). Las especies electrofílicas pueden reaccionar con centros nucleofílicos de las células para formar aductos covalentes, que pueden alterar permanentemente la estructura y actividad de la macromolécula diana (**Figura 3**). Su interacción con ácidos nucleicos puede derivar en daño al ADN (modificación de bases, rupturas de la hebra) y genotoxicidad. Los grupos sulfidrido de la cisteína y los nitrógenos nucleofílicos de algunos aminoácidos (por ejemplo, histidina, lisina o arginina) son dianas comunes en las proteínas. La modificación covalente de enzimas, transportadores, receptores y otras proteínas celulares puede resultar en el deterioro directo de funciones metabólicas clave, alteración de las vías de señalización,

desequilibrio iónico, pérdida de la homeostasis fisiológica y muerte celular (12,14). Algunas proteínas modificadas también pueden servir como inmunógenos (haptización) e inducir una respuesta inmune.

La bioactivación también puede inducir daño celular a través de la generación de radicales derivados del metabolismo oxidativo del fármaco o por formación de ROS (Ioannides y Lewis 2004). Esto último es frecuente para los compuestos que experimentan ciclos redox (por ejemplo, quinonas). Las especies radicalarias pueden inducir daño celular por unión covalente a macromoléculas de forma similar a los intermedios electrofílicos (23) y también son capaces oxidar componentes celulares esenciales (**Figura 3**). El ataque oxidativo al ADN puede producir mutaciones y carcinogénesis. La oxidación de residuos de aminoácidos clave puede conducir a inactivación enzimática o pérdida de otras funciones proteicas. Los lípidos insaturados, particularmente los componentes de las membranas celulares, son altamente susceptibles al daño oxidativo por ROS y otras especies oxidantes. La peroxidación lipídica es una secuencia de reacciones radicalarias que se propagan en cadena y que oxidan los lípidos con formación de peróxidos lipídicos. El estrés oxidativo, la destrucción progresiva de los lípidos de la membrana, la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, la alteración de la homeostasis del calcio intracelular o la pérdida de la integridad de la membrana celular son consecuencias de la peroxidación lipídica (12).

La propensión de un compuesto relativamente inerte para transformarse en un metabolito reactivo depende principalmente de su estructura química. El análisis exhaustivo de fármacos objeto de medidas reguladoras o con advertencias de uso por hepatotoxicidad idiosincrásica



ha permitido la propuesta de grupos funcionales o motivos químicos susceptibles de formar intermediarios reactivos (25). Estas alertas estructurales (toxicóforos) incluyen aminopiridinas, anilinas, furano, hidrazinas, tiazoles, tiofeno, catecol, ciclopropilamina, nitrobenzono, ácidos heteroarilacéticos y ácidos arilacéticos (22). Se han diseñado aplicaciones informáticas que incorporan información sobre el metabolismo y la toxicidad de fármacos conocidos con el objetivo de desarrollar sistemas capaces de predecir el metabolismo oxidativo de nuevos compuestos y anticipar la posible formación de metabolitos reactivos. La finalidad de estas herramientas *in silico* es servir de ayuda para el diseño químico y propuesta de moléculas durante el descubrimiento de nuevos fármacos (12). Se dispone asimismo de ensayos *in vitro* para identificar la posible bioactivación de moléculas candidatas. Básicamente estos ensayos consisten en la incubación del compuesto con un sistema biológico que presente una actividad metabólica elevada (microsomas hepáticos, preparaciones enzimáticas) y la posterior aplicación de métodos que permitan revelar la formación de metabolitos reactivos (detección de aductos con proteínas hepáticas, captura o *trapping* de metabolitos, inhibición en enzimas) (12,22,26). La información proporcionada por estos estudios se utiliza para identificar

y descartar compuestos de riesgo durante las fases tempranas del descubrimiento de fármacos y seleccionar aquellas moléculas con menor tendencia a la bioactivación.

En vista del papel clave del metabolismo de fármacos en la hepatotoxicidad, varios estudios han establecido asociaciones potenciales entre los polimorfismos genéticos de enzimas de biotransformación y el aumento del riesgo de hepatotoxicidad de ciertos fármacos (Tabla 1) (27-30). La susceptibilidad individual se ha relacionado también con variantes polimórficas o mutaciones puntuales en proteínas implicadas en el transporte de fármacos o en la defensa antioxidante (31,32). Estos hallazgos sugieren que la toxicidad se produce ante un desequilibrio entre la producción de metabolitos reactivos y su desintoxicación, tal y como ocurre en situaciones que conducen a una actividad aumentada de vías de bioactivación y/o una menor capacidad de neutralizar especies reactivas. Por tanto, no sólo la mayor o menor tendencia de un fármaco a producir intermediarios reactivos, sino también ciertos factores de riesgo preexistentes en pacientes susceptibles (genotipo, edad, sexo, inducción/inactivación enzimática, enfermedades subyacentes) van a ser determinantes en la aparición de hepatotoxicidad idiosincrásica.

**Tabla 1. Factores genéticos asociados a un mayor riesgo de susceptibilidad individual a la hepatotoxicidad por fármacos**

Genes polimórficos asociados	Fármacos	Referencias
CYP2E1, NAT2, GSTM1, GSTT1	Isoniazida y otros agentes antituberculosos	(29)
CYP2C8, UGT2B7, ABCC2	Diclofenac	(27)
CYP2B6	Ticlopidina	(28)
GSTM1/GSTT1 (doble nulo)	Varios fármacos (antibióticos, AINEs)	(30)
UGT1A1	Pazopanib	(29)
ABCB11	Estrógenos	(32)
MnSOD2, GPX1	Varios fármacos	(31)
POL G1	Valproato	(32)
HLA-A, HLA-B	Amoxicilina-Clavulánico	(32)
HLA-DRB1/DQB1	Varios fármacos colestáticos	(32)

#### 4. ESTRATEGIAS *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA HEPATOTOXICIDAD POR FÁRMACOS

La relación entre bioactivación y hepatotoxicidad es compleja y permanece sin estar completamente esclarecida, incluso para los fármacos más investigados (8). El hecho de que un fármaco pueda transformarse en un metabolito reactivo no implica necesariamente que llegue a inducir un efecto tóxico. Si la bioactivación representa una ruta secundaria del metabolismo del fármaco, la formación de intermediarios reactivos puede minimizarse mediante otras vías metabólicas que conducen a la conversión masiva del fármaco en metabolitos estables no tóxicos. Además, los metabolitos perjudiciales formados en las vías de bioactivación pueden ser neutralizados por los mecanismos de defensa celular (unión a GSH, sistemas de defensa antioxidante y eliminación de especies

electrofilicas), evitando que lleguen a producir efectos nocivos. Y aún en el caso de que llegaran a formarse aductos con macromoléculas celulares, la identidad de la molécula diana, su función bioquímica, la magnitud de la modificación covalente o la eficacia de los mecanismos de reparación o sustitución serían los determinantes del efecto tóxico final (12,23,26). Por tanto, durante el desarrollo farmacéutico se hace necesario no sólo comprobar la formación de metabolitos potencialmente tóxicos, sino también verificar la capacidad de éstos de inducir daño celular.

##### 4.1. Modelos celulares

Los ensayos *in vitro* de toxicidad basados en células tienen el potencial de proporcionar información rápida y económicamente viable que sirva de retroalimentación durante las fases tempranas del desarrollo farmacéutico. La

capacidad de estos ensayos para predecir el efecto tóxico del fármaco depende de forma crítica de las características y comportamiento funcionales de las células utilizadas. Por ello, en los últimos años se están realizando esfuerzos importantes encaminados al desarrollo y optimización de ensayos *in vitro* basados en células hepáticas capaces de identificar/anticipar la hepatotoxicidad inducida por nuevos fármacos. Los modelos celulares que se utilizan en estudios de hepatotoxicidad son muy diversos y comprenden desde los modelos más tradicionales, como las líneas celulares de hepatoma o los hepatocitos primarios cultivados en monocapa, hasta modelos surgidos más recientemente, como sistemas celulares complejos en configuración 3D o células hepáticas derivadas de células madre. Las ventajas e inconvenientes de los diferentes modelos hepáticos han sido ampliamente revisadas en publicaciones previas (33,34). Cada sistema celular presenta características bien definidas y aporta un enfoque particular a la hora de abordar la toxicidad por fármacos. En la Tabla 2 se reflejan los modelos celulares más aplicados en la actualidad para el estudio de la hepatotoxicidad idiosincrática y aquellos considerados con mayor proyección en un futuro próximo.

Las líneas de hepatoma son muy utilizadas para el cribado de compuestos y, dentro de su limitación funcional, posibilitan el estudio de los mecanismos implicados en la toxicidad. Los hepatocitos constituyen un modelo más diferenciado y cercano al hígado, si bien su comportamiento funcional y sus aplicaciones dependen en gran medida de la modalidad de cultivo utilizada. Los hepatocitos en monocapa conservan niveles aceptables de enzimas de metabolización de fármacos y son muy apreciados en estudios dirigidos a profundizar en los mecanismos de toxicidad. Las mejoras en los protocolos de crioconservación han incrementado la disponibilidad de hepatocitos humanos y han contribuido a extender su uso para la evaluación rutinaria de la hepatotoxicidad de nuevos fármacos (33). En un intento por mejorar las funciones hepáticas durante periodos de cultivo más largos, se ha propuesto el cultivo de hepatocitos en configuración sándwich (entre dos capas de colágeno u otros componentes de la matriz extracelular). Los hepatocitos mantenidos en esta configuración restauran la

polaridad característica de los hepatocitos *in vivo*, restablecen el transporte funcional de fármacos y moléculas endógenas a través de las membranas basolateral y biliar, por lo que son considerados un sistema *in vitro* útil para el estudio de fármacos con efectos colestásicos y de alteración del transporte hepatobiliar (33). Los hepatocitos en formatos 3D, que recrean la organización espacial de las células en el hígado, facilitan el restablecimiento de los contactos célula-célula y el mantenimiento prolongado de funciones específicas. Diversos estudios apuntan que los hepatocitos en sistemas 3D ofrecen una mejor predicción de la toxicidad humana que los cultivos convencionales, posibilitan la realización de estudios de toxicidad crónica y pueden ser de gran valor para la propuesta de biomarcadores de hepatotoxicidad (34-36).

No existe un solo modelo *in vitro* capaz de reproducir y/o anticipar la hepatotoxicidad de cualquier fármaco y las predicciones de daño hepático se benefician del uso combinado de varios sistemas celulares. La dificultad aún es mayor a la hora de predecir las reacciones de naturaleza idiosincrática. Los hepatocitos y las líneas celulares de hepatoma, los modelos más utilizados en los ensayos de hepatotoxicidad, no satisfacen los requisitos experimentales para reproducir y controlar los factores que determinan la susceptibilidad individual en la hepatotoxicidad idiosincrática, por lo que se hace necesaria la disponibilidad de modelos celulares alternativos (34). Para alcanzar este desafío se han propuesto nuevas estrategias entre las que se incluyen la transfección de células con vectores adenovirales que codifican genes de enzimas de biotransformación para el estudio de la idiosincrasia metabólica, la generación de células con fenotipo hepático a partir de células pluripotentes inducidas (iPSC) de pacientes específicos y el co-cultivo de hepatocitos con células hepáticas no parenquimatosas (células Kupffer, estrelladas, endoteliales,...) para el estudio del papel de estas células en el daño hepatotóxico mediado por señales inflamatorias y por el sistema inmune (33-36). Estos modelos parecen alternativas prometedoras, si bien su utilidad real no ha sido suficientemente contrastada.

**Tabla 2. Modelos celulares de aplicación al estudio de hepatotoxicidad inducida por fármacos**

Modelo	Principales aplicaciones
Hepatocitos cultivados en monocapa.	Los hepatocitos primarios, y en concreto los de origen humano, son considerados como el modelo celular que reproduce mejor la fisiología y funcionalidad del hígado humano ( <i>gold standard</i> ). Se trata de un modelo muy utilizado para el cribado de compuestos hepatotóxicos, el estudio de mecanismos de toxicidad y de efectos de los fármacos sobre funciones hepáticas específicas, ensayos de unión covalente y de generación de metabolitos reactivos. También se aplican para el análisis del perfil metabólico de fármacos y de interacciones fármaco-fármaco.
Hepatocitos cultivados en <i>sándwich</i> (entre dos capas de colágeno u otros componentes de la matriz extracelular).	Este sistema de cultivo mejora la supervivencia de los hepatocitos en cultivo y la expresión de diversas funciones hepáticas, y entre ellas, el transporte de moléculas a través de las membranas del hepatocito. Este modelo celular es particularmente útil para estudiar el transporte hepatobiliar de fármacos, la hepatotoxicidad inducida por compuestos colestásicos y los efectos de fármacos sobre transportadores hepáticos clave (BSEP, NTCP).
Cultivos 3D organotípicos.	Los sistemas 3D de cultivo tratan de reproducir el entorno fisiológico y la organización celular del hígado in vivo. Los hepatocitos pueden ser cultivados durante periodos prolongados (varias semanas), lo que posibilita los estudios a largo plazo (toxicidad crónica). Los sistemas de co-cultivo permiten evaluar la toxicidad sobre diferentes tipos de células hepáticas y la contribución de células no parenquimatosas al daño hepatotóxico de naturaleza idiosincrásica (liberación de señales inflamatorias, papel de células Kupffer, etc.).
Líneas celulares de hepatoma (HepG2, HepaRG)s.	Su elevada disponibilidad, fácil manejo, bajo coste y estabilidad fenotípica convierten a estas células en las más utilizadas para los estudios <i>in vitro</i> de hepatotoxicidad durante el desarrollo de nuevos fármacos ( <i>screening</i> de largas series de compuestos). Su uso combinado con aproximaciones multiparamétricas (transcriptómicas, metabolómicas y HCS) ha permitido el desarrollo de ensayos para identificar/clasificar compuestos que inducen hepatotoxicidad a través de diferentes mecanismos.
Líneas celulares hepáticas manipuladas (expresión de enzimas CYP y de fase II).	Mediante el uso de vectores virales se obtienen células que expresan de forma estable o transitoria un enzima o varios enzimas implicados en la biotransformación de fármacos. Las aplicaciones potenciales de estas células son la identificación de los enzimas responsables del metabolismo de fármacos y de la generación de metabolitos reactivos, el cribado de moléculas bioactivables, el análisis del papel del metabolismo en la hepatotoxicidad idiosincrásica y la identificación de perfiles metabólicos con mayor riesgo de hepatotoxicidad.
Hepatocitos derivados de células iPSC (modelos personalizados).	Las células con fenotipo hepático ( <i>hepatocyte-like cells</i> ) diferenciadas a partir de células iPSC se presentan como una alternativa ideal para obtener "hepatocitos" <i>in vitro</i> con las características individuales (fenotipo) del donante del que han sido obtenidas. Su uso permitiría analizar el efecto de polimorfismos genéticos y otros factores individuales sobre el riesgo/susceptibilidad a determinados grupos de fármacos. Además la obtención de estas células a partir de individuos que han sufrido episodios de hepatotoxicidad permitiría estudiar sobre células del propio paciente los efectos del fármaco responsable del episodio tóxico.

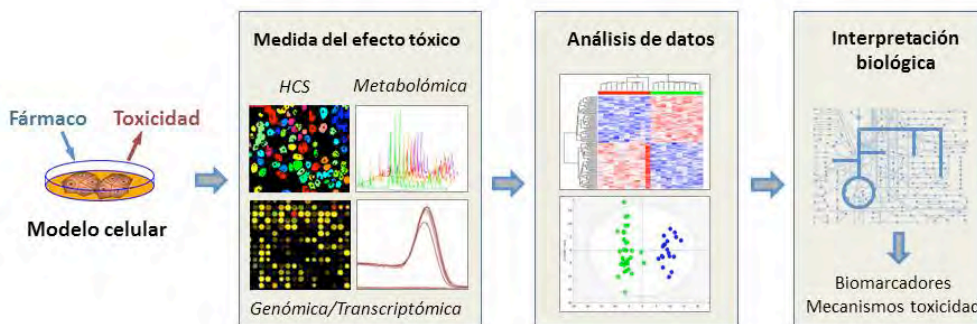
#### 4.2. Aproximaciones experimentales

Otro aspecto clave en las evaluaciones de toxicidad son los procedimientos o tests utilizados para identificar el daño inducido por el fármaco. Los ensayos citotoxicidad convencionales están basados en la medida de parámetros o marcadores individuales que informan sobre alteraciones

en el número de células, viabilidad, integridad de la membrana o depleción de moléculas críticas. Estos tests muestran una baja sensibilidad para identificar moléculas hepatotóxicas debido, entre otras razones, a que solo detectan eventos que ocurren en las últimas etapas de la citotoxicidad, cercanas a la muerte celular (5). La

alternativa son las estrategias multiparamétricas basadas en la medida simultánea de un conjunto amplio de marcadores que informan sobre alteraciones moleculares,

bioquímicas o funcionales, posibilitan la detección de alteraciones tempranas (pre-letales) y aportan una visión global de la toxicidad (Figura 4) (5,37).



**Figura 4. Aplicación de estrategias multi-paramétricas para el estudio de la hepatotoxicidad en modelos celulares.**

El desarrollo de plataformas “ómicas” ha reorientado la investigación en diferentes áreas del conocimiento, como es el caso de la toxicología. Las “ómicas” posibilitan el análisis masivo de cientos de biomoléculas (genes, proteínas, metabolitos), lo que nos permite disponer de un reflejo fiel de los distintos procesos que están ocurriendo en la célula a nivel molecular (38-40). En concreto la transcriptómica y la metabolómica, a través del análisis de los perfiles de expresión génica y de los perfiles metabólicos respectivamente, han recibido una gran acogida a la hora de evaluar los efectos tóxicos de los fármacos sobre células en cultivo (39,42).

La premisa que subyace en la aplicación de la transcriptómica al estudio de la toxicidad es que la homeostasis celular se altera tras un efecto adverso producido por un tóxico y la célula intenta restaurarla activando o inactivando la expresión de genes específicos. La huella transcriptómica resultante (alteraciones en niveles de mRNAs) puede ser descifrada y usada para identificar marcadores potenciales de hepatotoxicidad y definir cambios a nivel molecular característicos de cada uno de los mecanismos de toxicidad (41,43). Estos perfiles transcriptómicos pueden constituir una herramienta muy potente para predecir la toxicidad de un fármaco candidato e incluso clasificarlo en función de su mecanismo, basándose en el concepto de que mecanismos similares de toxicidad provocan cambios comparables en la expresión génica (39,43).

La metabolómica se basa en el análisis exhaustivo y cuantitativo de todos los metabolitos de bajo peso molecular (metaboloma) presentes en una muestra biológica. Esta disciplina completa la información mecanística aportada por otras “ómicas” y ofrece aspectos ventajosos al proporcionar una información más cercana sobre el estado funcional o metabólico de la célula en un momento determinado y, por tanto, refleja mejor los cambios fenotípicos (39,44). Los avances técnicos en las plataformas metabolómicas han posibilitado su expansión hacia diversos campos de investigación. El análisis de los

cambios en el metaboloma tras la exposición a un tóxico posibilita la identificación de huellas toxico-metabolómicas, un mejor conocimiento de los mecanismos de toxicidad y la propuesta de nuevos biomarcadores (39). Si bien su aplicación a estudios de toxicidad en modelos celulares es incipiente, los resultados obtenidos son prometedores y sugieren que la toxicometabolómica puede llegar a convertirse en un futuro cercano en una herramienta muy potente para discriminar el potencial hepatotóxico de nuevos fármacos (39,42,45).

En la última década, los sistemas de rastreo de alto contenido (*high content screening*, HCS) han ganado una rápida aceptación en el campo de la toxicología *in vitro* como una tecnología con un enorme potencial para evaluar los efectos perjudiciales de fármacos y otros productos químicos (5,46,47). Los ensayos HCS, basados en la aplicación de la microscopía automatizada y el análisis de imágenes a células en cultivo, permiten la medición de una amplia gama parámetros a nivel celular. El uso combinado de varios marcadores fluorescentes posibilita el análisis paralelo de múltiples marcadores celulares y la detección cuantitativa y la monitorización cinética de alteraciones morfológicas, bioquímicas o funcionales inducidas por el fármaco (5,46). Al integrar los datos obtenidos de diferentes indicadores de función celular permiten distinguir no sólo efectos tardíos/irreversibles sino también cambios tempranos/reversibles, proporcionando un análisis más detallado de la toxicidad inducida por el compuesto y del mecanismo implicado (46-49).

## 5. APLICACIÓN DE MODELOS CELULARES PARA INVESTIGAR EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS

Los estudios preclínicos de seguridad son de aplicación obligatoria durante el desarrollo farmacéutico. Desde hace décadas los modelos basados en células hepáticas vienen siendo utilizados, junto con métodos tradicionales *in vivo*, para la selección de moléculas y la toma de decisiones durante las fases tempranas de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Durante este tiempo se han realizado

importantes avances con miras a mejorar la capacidad predictiva de los ensayos *in vitro* de hepatotoxicidad humana. En la presente sección se muestran ejemplos de la contribución de diferentes modelos *in vitro* a la hora de evaluar y anticipar el riesgo potencial de hepatotoxicidad de los fármacos, así como para ampliar el conocimiento de los mecanismos implicados en la toxicidad y ayudar a la comprensión de los factores que determinan la susceptibilidad individual.

### 5.1. Predicción del potencial hepatotóxico

Las líneas de hepatoma HepG2 y HepaRG y los hepatocitos humanos en cultivo primario son los modelos celulares más utilizados en la actualidad por la industria farmacéutica para evaluar hepatotoxicidad de nuevas moléculas (34). Su uso combinado con ensayos multiparamétricos ha permitido desarrollar herramientas muy potentes que cada vez tienen mayor aceptación en los estudios de seguridad de fármacos. Recientemente se han propuesto diferentes ensayos HCS que han mostrado gran especificidad y selectividad para identificar compuestos con capacidad de inducir daño hepático (5,47,50). La mayor parte de estos ensayos utilizan células HepG2 expuestas al compuesto a estudiar y sobre las que se analizan no sólo eventos de toxicidad tardía (viabilidad celular), sino también en otros parámetros indicativos de toxicidad temprana (generación de ROS, aumento de calcio intracelular, disfunción mitocondrial, cambios nucleares, etc). Las plataformas HCS automatizadas integran de forma rápida los datos obtenidos a partir de diferentes indicadores de función celular y pueden incorporarse fácilmente y con alto rendimiento en los procesos de cribado de compuestos, facilitando la identificación temprana de aquellos con potencial hepatotóxico y contribuyendo al desarrollo de fármacos más seguros (5,46). La metabolómica también se ha mostrado como una estrategia sensible y eficaz para evaluar efectos tóxicos sobre células en cultivo (42,45), aunque su elevada exigencia desde el punto de vista técnico supone una importante limitación para el cribado de largas series compuestas. No obstante la toxicometabolómica puede aplicarse de forma complementaria a otras plataformas, por ejemplo los ensayos HCS, para confirmar la toxicidad en moléculas seleccionadas y puede aportar información de gran valor en la propuesta de biomarcadores de hepatotoxicidad.

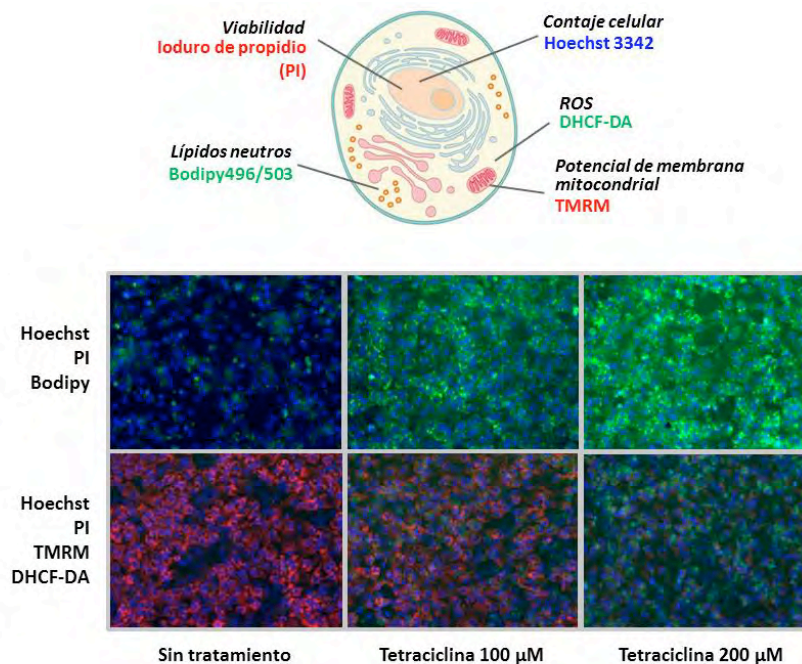
Las estrategias multiparamétricas basadas en el examen de una batería de marcadores pre-letales ofrecen la posibilidad de detectar cambios sutiles relacionados con la toxicidad con mayor sensibilidad que los ensayos de convencionales que detectan sólo citotoxicidad manifiesta (5,50). Ello hace posible detectar alteraciones inducidas a concentraciones más bajas del compuesto y, por tanto, más cercanas a los niveles del fármaco alcanzados en el plasma o el tejido hepático durante su administración terapéutica, lo que permite obtener información relevante desde el punto de vista clínico. El uso de bajas concentraciones

permite además el diseño de estudios de toxicidad a largo plazo con adiciones repetidas de los fármacos para imitar un régimen de dosificación crónica en la administración de fármacos (14). Un valor añadido de las evaluaciones multiplexadas es que no sólo se obtiene información sobre múltiples parámetros celulares, sino que también se pueden establecer relaciones entre diferentes parámetros medidos en la misma célula, lo que podría contribuir a interpretar mejor los cambios observados.

### 5.2. Clasificación de los mecanismos de hepatotoxicidad

Los ensayos generales de hepatotoxicidad permiten la identificación de compuestos capaces de inducir daño celular, independientemente del mecanismo implicado en su toxicidad. Con la finalidad de discriminar los compuestos que actúan a través de un mecanismo particular, se analizan diversos parámetros específicos que incluyen marcadores de daño a biomoléculas, alteraciones bioquímicas, alteración de la homeostasis celular, desregulación metabólica, alteración de actividades enzimáticas o de transporte y deterioro estructural o funcional de los componentes celulares (14). Este conocimiento mecanístico es relevante para mejorar la evaluación del balance eficacia/seguridad de los fármacos; sin embargo, los ensayos convencionales miden de forma individualizada un único parámetro, por lo que se requiere la aplicación de una batería de tests, lo que dificulta y entorpece la obtención de información (5).

Una estrategia útil para obtener una visión preliminar del mecanismo implicado en la hepatotoxicidad de un fármaco o grupo de fármacos es la evaluación combinada de múltiples parámetros, cada uno indicativo de un mecanismo concreto. Los ensayos HCS basados en la medida simultánea de parámetros que informan sobre alteraciones celulares clave (por ejemplo, apoptosis, estrés oxidativo, desregulación de la homeostasis del calcio, disfunción mitocondrial, etc.) son una buena alternativa. Una vez sugerido un mecanismo(s) particular(es), el análisis posterior de marcadores específicos ayuda a completar la información. Para ello, se han propuesto diferentes ensayos HCS dirigidos a examinar de forma específica los principales mecanismos implicados en la hepatotoxicidad: estrés oxidativo, toxicidad mitocondrial, genotoxicidad, esteatosis, colestasis, fosfolipidosis (ver revisión en 47). La información aportada por estos ensayos viene limitada por la necesidad de incubar las células con una mezcla de marcadores fluorescentes ópticamente compatibles. Mediante una adecuada selección de fluoróforos con longitudes de onda de absorción y emisión no superpuestas es posible diseñar baterías de colorantes (combinaciones de hasta cinco sondas fluorescentes) que informan de forma simultánea sobre un conjunto de alteraciones celulares relacionadas con el mecanismo estudiado (**Figura 5**) (48,49).



**Figura 5. Ensayo HCS de esteatosis inducida por fármacos.** El ensayo consiste en la utilización de células fluorescentes para medir los efectos de los fármacos sobre la acumulación intracelular de lípidos neutros (BODIPY 493/503), la formación de ROS (DCF), el potencial de membrana mitocondrial (TMRM) y la viabilidad celular. Los fluorocromos se pueden combinar atendiendo a su compatibilidad óptica. Las fotografías muestran las alteraciones observadas en células HepG2 tratadas durante 24 h con tetraciclina (fármaco con capacidad esteatótica). DHCF-DA, 2',7-Dihidro dicloro fluoresceína diacetato; TMRM, tetrametilrodamina metil éster).

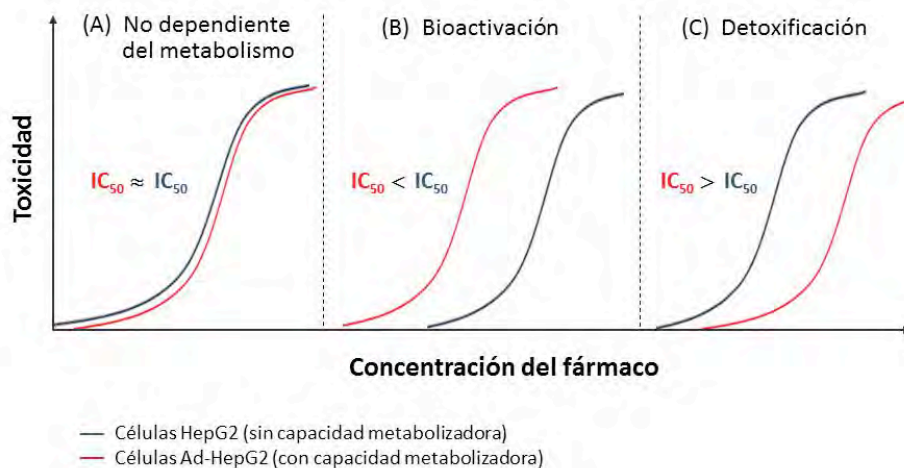
Una de las ventajas del uso de enfoques holísticos, como es el caso de la metabolómica, es que aportan una instantánea más completa de la perturbación inducida por el fármaco (44). Los cambios en el metaboloma informan sobre la respuesta dinámica del metabolismo celular ante la agresión tóxica y ayudan a comprender el mecanismo subyacente (39). Es lógico pensar que las alteraciones metabólicas desencadenadas por un fármaco se pueden relacionar con el tipo de daño inducido y que diferentes mecanismos de toxicidad generan perfiles metabolómicos diferentes. Estudios recientes basados en la aplicación de aproximaciones metabolómicas UPLC/MS/MS a células HepG2 tratadas con compuestos modelo evidencian la capacidad de esta estrategia para el estudio de los mecanismos de hepatotoxicidad (42,45). Tras el análisis multivariante de los datos extraídos de los perfiles toxicometabolómicos se obtuvo un modelo predictivo que permitía no sólo discriminar entre fármacos no hepatotóxicos y hepatotóxicos, sino también clasificar

estos últimos según su principal mecanismo de toxicidad (estrés oxidativo, esteatosis, fosfolipidosis). Además, la posibilidad de identificar los metabolitos característicos/discriminantes de cada mecanismo es un excelente punto de partida para la propuesta de posibles biomarcadores diagnósticos.

### 5.3. Toxicidad de moléculas bioactivables

La influencia del metabolismo de un fármaco sobre su toxicidad se puede analizar fácilmente *in vitro* comparando sus efectos sobre células con o sin capacidad biotransformadora (**Figura 6**). Para el desarrollo de esta estrategia se han utilizado fundamentalmente dos modelos celulares: células THLE manipuladas para la expresión permanente de un enzima CYP o células HepG2 transfectadas con vectores adenovirales para la expresión transitoria de enzimas de biotransformación.





**Figura 6. Ensayo in vitro para estudiar la influencia del metabolismo sobre la hepatotoxicidad de fármacos.** El ensayo compara la toxicidad del fármaco en células HepG2 y en células Ad-HepG2 (modificadas con adenovirus para conferirles expresión de enzimas de metabolización de fármacos). Efectos similares del fármaco sobre ambos tipos de células indican que la toxicidad no depende del metabolismo del fármaco (A). Una toxicidad mayor sobre células Ad-HepG2 (efectos tóxicos a concentraciones más bajas del fármaco) sugiere que se trata de un fármaco bioactivable (B). La mayor sensibilidad de las células HepG2 indica que el metabolismo contribuye a la detoxificación (C).

Las células CYP-THLE han sido generadas mediante el uso de vectores virales que se integran en el genoma de la célula y permiten una sobreexpresión estable e individual de un único CYP. La evaluación de la toxicidad de un fármaco sobre una batería de células CYP-THLE (CYP1A2-THLE, CYP3A4-THLE, etc) y sobre las células parentales THLE (que no expresan CYPs) es posible estudiar la contribución del metabolismo mediado por cada uno de los CYPs (51). Sin embargo, una limitación importante de las células CYP-THLE es que muestran una expresión desequilibrada de los enzimas de biotransformación, con niveles altos del CYP sobreexpresado y presencia muy reducida o nula del resto de enzimas (otros CYPs y enzimas de conjugación). Esto es debido a que los procedimientos utilizados para la generación de estas células no permiten la expresión controlada del CYP de interés ni la introducción de varios transgenes, por lo que los niveles de actividad resultantes son con frecuencia muy diferentes a los de los hepatocitos humanos (52).

Como alternativa, se ha propuesto el uso de vectores adenovirales para la obtención de células HepG2 con capacidad metabólica adecuada para estudios de hepatotoxicidad (48,52). Los adenovirus recombinantes permiten la introducción eficaz y controlada de genes de interés en células hepáticas, si bien la expresión es transitoria y se debe realizar una nueva transfección para cada experimento. Una gran ventaja de esta estrategia es que se pueden generar con facilidad células que expresan simultáneamente varios enzimas y, además, es posible seleccionar el nivel de actividad enzimática que se desea obtener (33,53). Utilizando este procedimiento se han generado con éxito células AdvCYP-HepG2 que co-expresan los cinco CYPs más importantes en el metabolismo hepático de fármacos (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4) a niveles similares al

hepatocito humano (48). Este modelo de “hepatocito artificial”, llamado así por su semejanza metabólica con los hepatocitos humanos, se ha mostrado muy eficaz para discriminar entre fármacos bioactivables (más tóxicos en células AdvCYP-HepG2 que en células HepG2 no transfectadas) y no bioactivables (la misma toxicidad sobre ambos tipos celulares).

#### 5.4. Identificación de perfiles metabólicos con mayor riesgo de hepatotoxicidad

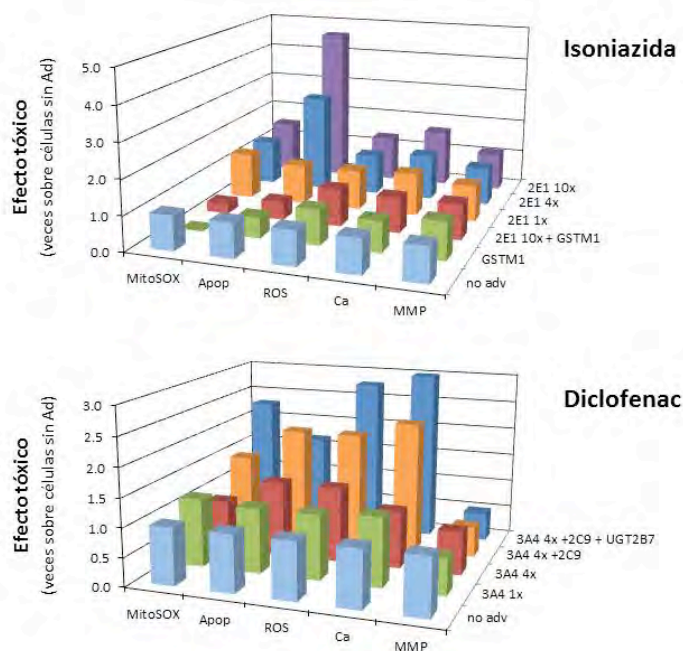
Dada la variabilidad interindividual en la expresión de enzimas hepáticos implicados en el metabolismo de fármacos, cada persona o grupo de población muestra una capacidad metabólica característica y, en consecuencia, una susceptibilidad potencialmente única a la hepatotoxicidad. Es razonable suponer que los individuos con un fenotipo metabólico que tiene como resultado un aumento en la generación de metabolitos reactivos a partir de un fármaco dado mostrarán un riesgo aumentado de hepatotoxicidad inducida por ese fármaco; mientras que aquellos pacientes con un metabolismo acelerado de inactivación serán menos sensibles al fármaco. La disponibilidad de estrategias *in vitro* capaces de imitar diferentes fenotipos metabólicos característicos del hígado humano sería de utilidad indudable para anticipar el daño tóxico asociado a la idiosincrasia metabólica y mejorar con ello la predicción de la hepatotoxicidad.

La transducción mediada por adenovirus es un procedimiento simple, versátil y altamente reproducible para obtener células que co-expresan los niveles deseados de varias enzimas (33,48,54). Por lo tanto, la estrategia basada en el uso de diferentes combinaciones de adenovirus abre la posibilidad de generar una variedad de células que reproducen fenotipos metabólicos individualizados de interés para estudios de hepatotoxicidad (53). El estudio comparativo de los efectos de un fármaco sobre una batería de células con



diferentes perfiles metabólicos permitiría realizar predicciones *in vitro* sobre su hepatotoxicidad potencial en grupos particulares de población (por ejemplo, metabolizadores rápidos o lentos). Se trata de una estrategia innovadora y, si bien hasta el momento sólo se ha explorado en un número muy reducido de compuestos modelo, los resultados obtenidos son prometedores (33,53,54). A modo de prueba de concepto la **figura 7** muestra los efectos de isoniazida y diclofenac, dos fármacos con hepatotoxicidad idiosincrática y metabolismo hepático conocido, en células HepG2 creadas

*ad-hoc* con niveles variables de enzimas de biotransformación, observándose que la toxicidad de cada fármaco varía en función del nivel de expresión y/o de la combinación de enzimas CYPs y de fase II presente en las células. La aplicación de estos modelos celulares de idiosincrasia metabólica es de particular interés para el estudio de la hepatotoxicidad de fármacos que son metabolizados de forma mayoritaria por enzimas que muestran gran variabilidad fenotípica en la población (por ejemplo, enzimas polimórficos o inducibles).



**Figura 7. Estudio del efecto del perfil metabólico de las células sobre la hepatotoxicidad de fármacos.** El uso de diferentes combinaciones de adenovirus permite generar células HepG2 que expresan los niveles deseados de uno o varios enzimas de metabolización de fármacos. La utilización de marcadores fluorescentes y la aplicación de ensayos de rastreo de alto contenido (high content screening, HCS) permite la evaluación multi-paramétrica de la toxicidad en células expuestas durante 24 h a los fármacos. La toxicidad de isoniazida es mayor sobre las células con los niveles más altos de actividad CYP2E1 (2E1 x10), mientras que dichos efectos son contrarrestados por el enzima GSTM1 (2E1 x10 + GSTM1). La toxicidad del diclofenac varía en función de la mezcla de adenovirus de CYP3A4, CYP2C9 y UGT2B7 utilizada para preparar las células, siendo más sensibles las células co-transfectadas con la combinación de los tres adenovirus (3A4 + 2C9+ UGT2B7). MitoSox, superóxido mitocondrial; Apop, apoptosis; ROS, especies reactivas del oxígeno; Ca, concentración intracelular de calcio; MMP, potencial de membrana mitocondrial.

### 5.5. Modelos personalizados

Como se ha señalado anteriormente, el metabolismo juega un papel importante en la hepatotoxicidad idiosincrática, pero no es el único responsable del resultado final. Las reacciones idiosincráticas se presentan como un fenómeno multifactorial y en su aparición influyen características individuales muy diversas tales como la edad, sexo, raza, dieta, hábitos de consumo, enfermedades, inflamación o respuesta del sistema inmune. A pesar de los intentos realizados hasta el momento, no existen modelos preclínicos que permitan analizar este conjunto tan amplio de factores y la posible contribución de cada uno de ellos en la aparición de hepatotoxicidad en determinados pacientes; no obstante, se han propuesto modelos *in vitro* que cubren de forma individual algunos de los aspectos implicados en estos

episodios de naturaleza idiosincrática (12,34). En esta dirección, algunos autores apuestan por modelos experimentales que permitan analizar el papel de los diferentes tipos de células presentes en el hígado (por ejemplo, co-cultivos 3D de hepatocitos con células no parenquimatosas) o la contribución de mediadores solubles de estrés inflamatorio (por ejemplo, adición de citoquinas pro-inflamatorias al medio de cultivo) (55,56). Estos modelos persiguen imitar las interacciones celulares heterotípicas y el entorno fisiológico del hígado para facilitar la investigación de los mecanismos que subyacen en la hepatotoxicidad. Sin embargo, algunas cuestiones como la comprensión del por qué un determinado fármaco sólo induce daño hepático en un grupo concreto de pacientes o la identificación de aquellos pacientes con mayor susceptibilidad a la hepatotoxicidad por un fármaco

en concreto permanecen por resolver.

Disponer de modelos personalizados que reflejen el comportamiento de los hepatocitos de un determinado paciente puede ser clave para entender el fenómeno de la hepatotoxicidad idiosincrásica y con ello desarrollar herramientas diagnósticas para confirmar la sospecha de hepatotoxicidad y la causalidad de forma específica e inequívoca. La obtención directa de hepatocitos del paciente no es posible por razones obvias. La alternativa sería generar células con fenotipo hepático (hepatocyte-like cells, HLC) a partir de células del paciente que pudieran ser obtenidas de una manera éticamente aceptable. Esto es posible a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las iPSCs se pueden generar a partir de células obtenidas por procedimientos mínimamente invasivos y se han desarrollado protocolos para su diferenciación a células que expresan marcadores y características funcionales típicas del hígado (57). Las HLC derivadas de iPSC están emergiendo como una fuente potencialmente estable de células con fenotipo hepático para el cribado de nuevas moléculas durante el desarrollo de fármacos (58,59). En concreto, las HLC obtenidas a partir de pacientes con polimorfismos genéticos singulares serían de gran valor en las predicciones de toxicidad de fármacos. Además, la posibilidad de disponer de HLC de individuos que han sufrido episodios de hepatotoxicidad idiosincrásica constituiría una oportunidad única para estudiar *in vitro* el episodio clínico acontecido en el paciente (58,60). No obstante, las expectativas que ofrece este modelo celular se ven limitadas en la actualidad por la necesidad de introducir mejoras sustanciales en los protocolos de diferenciación de las iPSC para aumentar la calidad funcional de las HLC obtenidas.

## 6. CONCLUSIONES

Los episodios de hepatotoxicidad idiosincrásica son de muy difícil predicción durante el desarrollo de nuevos medicamentos. Los modelos animales son claramente insuficientes al no ser capaces de reproducir los múltiples factores de susceptibilidad (genéticos y adquiridos) que determinan las reacciones idiosincrásicas en el hombre. Las células hepáticas de origen humano constituyen, a priori, una buena alternativa. Los hepatocitos primarios y las líneas de hepatoma HepG2 o HepaRG son los modelos celulares más utilizados por la industria farmacéutica para el cribado de la hepatotoxicidad intrínseca de nuevas moléculas. Sin embargo, su idoneidad es limitada cuando se trata de estudiar la hepatotoxicidad idiosincrásica debido, entre otras causas, a su inestabilidad fenotípica (hepatocitos) o a su carácter tumoral y baja expresión de enzimas del metabolismo de fármacos (líneas de hepatoma). Además, en ambos casos la respuesta a la acción tóxica del fármaco está condicionada por las características genéticas del donante del que fueron obtenidas las células, por lo que se muestran incapaces de predecir la toxicidad idiosincrásica en individuos susceptibles. Es por ello que en los últimos años se está realizando un esfuerzo innovador encaminado a la

consecución de modelos hepáticos de aplicación al estudio de la hepatotoxicidad idiosincrásica. De la mano de los recientes avances técnicos en biología molecular y celular, se han alcanzado logros importantes no sólo en la optimización de sistemas de cultivo que mejoren la capacidad predictiva de los modelos disponibles (hepatocitos, células de hepatoma), sino también en la generación de nuevos modelos que reflejen la idiosincrasia individual característica del hígado humano (modelos personalizados). Además, la aplicación de plataformas ómicas facilita el análisis de los cambios celulares relacionados con el daño tóxico por fármacos y posibilita el desarrollo de ensayos sensibles y específicos para la detección de la hepatotoxicidad. Las perspectivas son prometedoras y cabe esperar que, en un futuro próximo, se puedan formular estrategias *in vitro* capaces de anticipar moléculas con potencial para inducir hepatotoxicidad idiosincrásica e identificar pacientes potencialmente vulnerables y, en base a ello, contribuir al desarrollo de fármacos más seguros.

## 7. CONFLICTO DE INTERESES

La autora declara no tener conflicto de intereses.

## 8. AGRADECIMIENTOS

La autora agradece la financiación recibida por parte del Instituto de Salud Carlos III (Plan Estatal de I+D+I 2013-2016) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través de las ayudas PI13/00986 y PI16/00333.

## 9. REFERENCIAS

1. Andrade RJ, Robles M, Fernandez-Castañer A, *et al.* Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: A challenge for gastroenterologists. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 329-40.
2. Chen M, Vijay V, Shi Q, Liu Z, *et al.* FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury. *Drug Discov Today* 2011; 16: 697-703.
3. Fontana RJ. Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives. *Gastroenterology* 2014; 146: 914-28.
4. Olson H, Betton G, Robinson D, *et al.* Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 32: 56-67.
5. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, *et al.* High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *in vitro* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening *Arch Toxicol* 2006; 80: 580-604.
6. Siramshetty VB, Nickel J, Omieczynski C, *et al.* WITHDRAWN--a resource for withdrawn and discontinued drugs. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: D1080-6.
7. Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, *et al.* Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 950-66.

8. Thompson RA, Isin EM, Ogese MO, *et al.* Reactive Metabolites: Current and Emerging Risk and Hazard Assessments. *Chem Res Toxicol* 2016; 29: 505-33.
9. Shaw PJ, Ganey PE, Roth RA. Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2010; 118:7-18.
10. Yano A, Oda S, Fukami T, *et al.* Development of a cell-based assay system considering drug metabolism and immune- and inflammatory-related factors for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol Lett* 2014; 228: 13-24.
11. Roth RA, Ganey PE. Intrinsic versus idiosyncratic drug-induced hepatotoxicity--two villains or one? *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 692-7.
12. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Metabolic activation and drug-induced liver injury: in vitro approaches for the safety risk assessment of new drugs. *J Appl Toxicol* 2016; 36: 752-68.
13. Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 2005; 5: 325-61.
14. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Gombau L, *et al.* In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1963-77
15. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV, *et al.* Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 443-62.
16. Roth RA, Ganey PE. Animal models of idiosyncratic drug-induced liver injury--current status. *Crit Rev Toxicol* 2011; 41: 723-39
17. Uetrecht J. Idiosyncratic drug reactions: current understanding. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 513-39.
18. Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22: 335-53.
19. Boelsterli UA, Lim PL. Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 220: 92-107.
20. Han D, Dara L, Win S, *et al.* Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34: 243-53.
21. Lammert C, Bjornsson E, Niklasson A, *et al.* Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events. *Hepatology* 2010; 51: 615-20.
22. Kalgutkar AS, Soglia JR. Minimising the potential for metabolic activation in drug discovery. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005; 1: 91-142.
23. Srivastava A, Maggs JL, Antoine DJ, *et al.* Role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity. *Handb Exp Pharmacol* 2010; 196: 165-94.
24. Leung L, Kalgutkar AS, Obach RS. Metabolic activation in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev* 2012; 44: 18-33.
25. Stepan AF, Walker DP, Bauman J, *et al.* Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 1345-410.
26. Thompson RA, Isin EM, Li Y, *et al.* Risk assessment and mitigation strategies for reactive metabolites in drug discovery and development. *Chem Biol Interact* 2011; 192: 65-71.
27. Daly AK, Aithal GP, Leathart JB, *et al.* Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology* 2007; 132: 272-81.
28. Ariyoshi N, Iga Y, Hirata K, *et al.* Enhanced susceptibility of HLA-mediated ticlopidine-induced idiosyncratic hepatotoxicity by CYP2B6 polymorphism in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010; 25: 298-306.
29. Hawkins MT, Lewis JH. Latest advances in predicting DILI in human subjects: focus on biomarkers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012; 8: 1521-30.
30. Lucena MI, Andrade RJ, Martínez C, *et al.* Spanish Group for the Study of Drug-Induced Liver Disease. Glutathione S-transferase m1 and t1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology* 2008; 48: 588-96.
31. Lucena MI, García-Martín E, Andrade RJ, *et al.* Mitochondrial superoxide dismutase and glutathione peroxidase in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2010; 52: 303-12.
32. Andrade R. Hepatopatía inducida por fármacos. XIX Curso de Postgrado AGA-SEPD. Semana de las Enfermedades Digestivas, Bilbao, 2-5 Junio 2012; pp.52-7. Disponible en: ([https://www.sepd.es/pdf/SED2012-Curso\\_%20AGA%20SEPD.pdf](https://www.sepd.es/pdf/SED2012-Curso_%20AGA%20SEPD.pdf))
33. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, *et al.* Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 2013; 87: 1315-530.
34. Gomez-Lechon MJ, Tolosa L, Conde I, *et al.* Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014; 10: 1553-68.
35. Sarkar U, Rivera-Burgos D, Large EM, *et al.* Metabolite profiling and pharmacokinetic evaluation of hydrocortisone in a perfused three-dimensional human liver bioreactor. *Drug Metab Dispos* 2015; 43: 1091-9.

36. Ware BR, Berger DR, Khetani SR. Prediction of Drug-Induced Liver Injury in Micropatterned Co-cultures Containing iPSC-Derived Human Hepatocytes. *Toxicol Sci* 2015; 145: 252-62.
37. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Donato MT. High-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in cell models. *Arch Toxicol* 2015; 89:1007-22.
38. Chen M, Zhang M, Borlak J, *et al.* A decade of toxicogenomic research and its contribution to toxicological science. *Toxicol Sci* 2012; 130:217-28.
39. Wilmes A, Limonciel A, Aschauer L, *et al.* Application of integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling for the delineation of mechanisms of drug induced cell stress. *J Proteomics* 2013; 79: 180-94.
40. Cho YE, Moon PG, Baek MC. An integrated proteomic and transcriptomic approach to understanding azathioprine- induced hepatotoxicity in rat primary hepatocytes. *Electrophoresis* 2014; 35: 911-22.
41. Benet M, Moya M, Donato MT, *et al.* A simple transcriptomic signature able to predict drug-induced hepatic steatosis. *Arch Toxicol* 2014; 88: 967-82.
42. García-Cañaveras JC, Jiménez N, Gómez-Lechón MJ, *et al.* LC-MS untargeted metabolomic analysis of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Electrophoresis* 2015 Jun 1. doi: 10.1002/elps.201500095.
43. Donato MT, López-Riera M, Castell JV, *et al.* Both cholestatic and steatotic drugs trigger extensive alterations in the mRNA level of biliary transporters in rat hepatocytes: Application to develop new predictive biomarkers for early drug development. *Toxicol Lett* 2016; 263: 58-67.
44. León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, *et al.* Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis* 2013; 34: 2762-75.
45. García-Cañaveras JC, Castell JV, Donato MT, *et al.* A metabolomics cell-based approach for anticipating and investigating drug-induced liver injury. *Sci Rep* 2016; 6: 27239.
46. Giuliano KA, Gough AH, Taylor DL, *et al.* Early safety assessment using cellular systems biology yields insights into mechanisms of action. *J Biomol Screen* 2010; 15: 783-97.
47. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Donato MT. High-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in cell models. *Arch Toxicol* 2015; 89: 1007-22.
48. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Pérez-Cataldo G, *et al.* HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Arch Toxicol* 2013; 87: 1115-27.
49. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Jiménez N, *et al.* Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016; 302: 1-9.
50. Tolosa L, Pinto S, Donato MT, *et al.* Development of a multiparametric cell-based protocol to screen and classify the hepatotoxicity potential of drugs. *Toxicol Sci* 2012; 127: 187-98.
51. Gustafsson F, Foster AJ, Sarda S, *et al.* A correlation between the in vitro drug toxicity of drugs to cell lines that express human P450s and their propensity to cause liver injury in humans. *Toxicol Sci* 2014; 137: 189-211.
52. Donato MT, Jover R, Gómez-Lechón MJ. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr Drug Metab* 2013; 14: 946-68.
53. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Upgrading HepG2 cells with adenoviral vectors that encode drug-metabolizing enzymes: application for drug hepatotoxicity testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2017; 13: 137-48.
54. Kwon SJ, Lee DW, Shah DA, *et al.* High-throughput and combinatorial gene expression on a chip for metabolism-induced toxicology screening. *Nat Commun* 2014; 5: 3739.
55. Cosgrove BD, King BM, Hasan MA, *et al.* Synergistic drug-cytokine induction of hepatocellular death as an in vitro approach for the study of inflammation-associated idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 237: 317-30.
56. Kostadinova R, Boess F, Applegate D, *et al.* A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 268:1-16.
57. Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, *et al.* An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet* 2014; 29: 237-43.
58. Kia R, Sison RL, Heslop J, *et al.* Stem cell-derived hepatocytes as a predictive model for drug-induced liver injury: are we there yet? *Br J Clin Pharmacol* 2013; 75: 885-96.
59. Gao X, Liu Y. A transcriptomic study suggesting human iPSC-derived hepatocytes potentially offer a better in vitro model of hepatotoxicity than most hepatoma cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2017 Jan 31. doi: 10.1007/s10565-017-9383-z.
60. Medine CN, Lucendo-Villarin B, Storck C, *et al.* Developing high-fidelity hepatotoxicity models from pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2: 505-9.

# Esteatosis hepática y colestasis inducida por medicamentos: nuevos mecanismos y biomarcadores

**Title in English:** *Drug-induced hepatosteatosis and cholestasis: novel mechanisms and biomarkers*

Ramiro Jover Atienza

Departamento Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València. Unidad Mixta en Hepatología Experimental. IIS Hospital La Fe de Valencia

**ABSTRACT:** Liver steatosis and cholestasis are two of the most common manifestations of hepatotoxicity. Drug-induced steatosis may be included in the spectrum of conditions that comprise the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). This disease is very prevalent and a significant part of the patients progress towards steatohepatitis, which is a condition with poor prognosis. Drugs can contribute to a greater or lesser extent to NAFLD. However, none of the current diagnostic tools is able to predict if the fat accumulated in the liver has a metabolic or iatrogenic origin. Recent studies in our laboratory have shown that steatotic drugs have a very significant impact on the hepatocyte transcriptome, which in turn has allowed us to find alterations in the level of some microRNAs, which are specifically induced by drugs; thus opening the path to postulate biomarkers for drug-induced steatosis. These small RNAs may become, in the future, a non-invasive diagnostic method as they are excreted into the bloodstream, where they can be analyzed and quantified easily. Cholestatic drugs adversely affect the biliary flow through the liver, causing accumulation of bilirubin (yellow pigmentation of the skin) and bile salts, which are toxic at high concentrations. This phenomenon is quite common and appears in almost 50 % of the clinical manifestations of hepatotoxicity. However, cholestasis occurs only in a fraction of patients taking the causative agent. One possible explanation for drug-induced cholestasis would be the direct inhibition of hepatobiliary transporters by drugs and another possibility would be the presence of polymorphisms in transporter genes that associate with slower transport and increased susceptibility. However, these mechanisms are not able to explain neither the idiosyncrasy of the response nor the high interindividual variability in the levels of the hepatobiliary transporters. We have investigated other possible mechanisms and have found that cholestatic drugs alter the expression of many transporter genes, suggesting that these drugs also affect the enterohepatic bile flow by interfering with transcriptional regulatory mechanisms.

**RESUMEN:** La esteatosis hepática y la colestasis son dos de las manifestaciones más habituales de la hepatotoxicidad. La esteatosis iatrogénica podría incluirse en el espectro de condiciones que presenta la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Esta enfermedad es muy prevalente y una parte significativa de los pacientes evolucionarán hacia esteatohepatitis, que es una condición con mal pronóstico. Los fármacos pueden contribuir en mayor o menor medida a la EHGNA. Sin embargo, ningún método diagnóstico actual es capaz de predecir si la grasa acumulada en el hígado tiene un origen metabólico o iatrogénico. Estudios recientes de nuestro laboratorio han permitido comprobar que los fármacos esteatósicos tienen un impacto muy significativo en el transcriptoma del hepatocito, lo que a su vez nos ha permitido postular a algunos microRNAs como biomarcadores de esteatosis por medicamentos. Estos pequeños RNAs podrían ser, en un futuro, un método diagnóstico no invasivo ya que son excretados al torrente circulatorio, donde pueden ser analizados y cuantificados fácilmente. Los fármacos colestásicos afectan negativamente el flujo biliar a través del hígado, provocando la acumulación de bilirrubina (pigmentación amarilla de la piel) y de ácidos biliares, que a concentraciones elevadas son tóxicos. Este fenómeno es bastante habitual y aparece en casi el 50 % de los cuadros clínicos de hepatotoxicidad. Sin embargo, la colestasis sólo se presenta en una fracción de los pacientes que toman el agente causal. Un posible mecanismo de la colestasis por fármacos es la inhibición directa de los transportadores hepatobiliares por los medicamentos, y otro es la existencia de polimorfismos en los genes de estos transportadores, asociados con una peor función y una mayor susceptibilidad. Sin embargo, estos mecanismos no pueden explicar la idiosincrasia de la respuesta ni la gran variabilidad interindividual en los niveles de los transportadores hepatobiliares. Nosotros hemos investigado otras posibles vías y hemos encontrado que los fármacos colestásicos también alteran la expresión de muchos de los genes de estos transportadores, lo que sugiere una interferencia con los mecanismos reguladores transcripcionales.

**Corresponding Author:** ramiro.jover@uv.es

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 2 (2017), pp. 284-293

## 1. HEPATOESTEATOSIS INDUCIDA POR MEDICAMENTOS

### 1.1. Metabolismo lipídico en el hígado

El hígado es un órgano central en el metabolismo de

los lípidos. Durante el **período postprandial**, los hepatocitos absorben ácidos grasos (AG) principalmente por la hidrólisis de los triglicéridos (TG) de los quilomicrones. La lipoproteína lipasa, que hidroliza las lipoproteínas ricas en TG, se sintetiza principalmente en el

tejido muscular y adiposo, y se transporta a las células endoteliales de los capilares. La lipoproteína lipasa hidroliza grasas dietéticas empaquetadas en los quilomicrones, liberando así AG, de los cuales aproximadamente el 20 % se envían al hígado unidos a la albúmina. Este proceso resulta en la conversión de los quilomicrones en remanentes, que también son importados a los hepatocitos por receptores de remanentes, a través de la interacción con la ApoE. Durante los **períodos de ayuno**, los hepatocitos absorben AG libres no esterificados derivados de la lipólisis del tejido adiposo (1). Además, los hepatocitos tienen la capacidad de sintetizar AG a partir del exceso de glucosa (lipogénesis *de novo*). Los AG, obtenidos de diversas fuentes, se utilizan para muchos procesos celulares importantes, como la síntesis de membranas celulares y para vías de señalización intracelular. Además, los AG hepáticos pueden oxidarse para producir acetil-CoA, que puede a su vez oxidarse para generar NADH y ATP, o utilizarse para sintetizar cuerpos cetónicos. Los AG también pueden utilizarse para la síntesis de TG, que se almacenan en gotas lipídicas dentro de hepatocitos, o secretarse al torrente circulatorio como partículas VLDL, que suministran TG hepáticos al tejido adiposo para su almacenamiento y al músculo como fuente de energía.

En resumen, en el hígado se pueden utilizar AG derivados de tejidos periféricos o de la dieta, así como AG sintetizados endógenamente para: 1) la producción de energía y cuerpos cetónicos a través de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, 2) la esterificación en TG y almacenamiento en gotas lipídicas (esteatosis), y 3) la síntesis de TG y formación de VLDL, junto con la ApoB, para la secreción en la circulación (2). Además, el hígado desempeña un papel importante en el metabolismo de colesterol y fosfolípidos.

La regulación del metabolismo de los lípidos en el hígado es compleja y quedan aspectos por descifrar; su alteración puede contribuir al establecimiento y progresión de varias enfermedades hepáticas, como el hígado graso no alcohólico (EHGNA). Por ello, la identificación de los actores claves involucrados en la regulación del metabolismo lipídico en el hígado puede contribuir a una mejor comprensión de diversas hepatopatías, así como facilitar el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas.

### 1.2. La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)

La EHGNA es una causa muy común de hepatopatía crónica, que está alcanzando proporciones de epidemia en los países desarrollados, donde afecta aproximadamente a un 20-30 % de los adultos y a un número creciente de niños. La enfermedad comienza con una acumulación anormal de TG en el hígado (esteatosis), que en algunos individuos desencadena una respuesta inflamatoria y fibrosis (esteatohepatitis no alcohólica, EHNA) que puede

progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (3, 4).

La principal asociación etiológica de la EHGNA es con el síndrome metabólico que está caracterizado por la coexistencia de varios factores de riesgo, incluyendo obesidad, resistencia a la insulina/diabetes mellitus tipo II, hiperglicemia, dislipidemia (TG  $\uparrow$ , HDL  $\downarrow$ ), e hipertensión arterial. La prevalencia de la EHGNA aumenta hasta el 70-90 % en estos pacientes, y también aumenta en paralelo el riesgo de fibrosis y cirrosis (5, 6). La EHGNA también se observa a menudo en los pacientes con hepatitis C crónica (hasta en un 50 %) (7) y en otras muchas y diversas patologías (disfunciones del intestino delgado, estados inflamatorios crónicos, metabolopatías etc.).

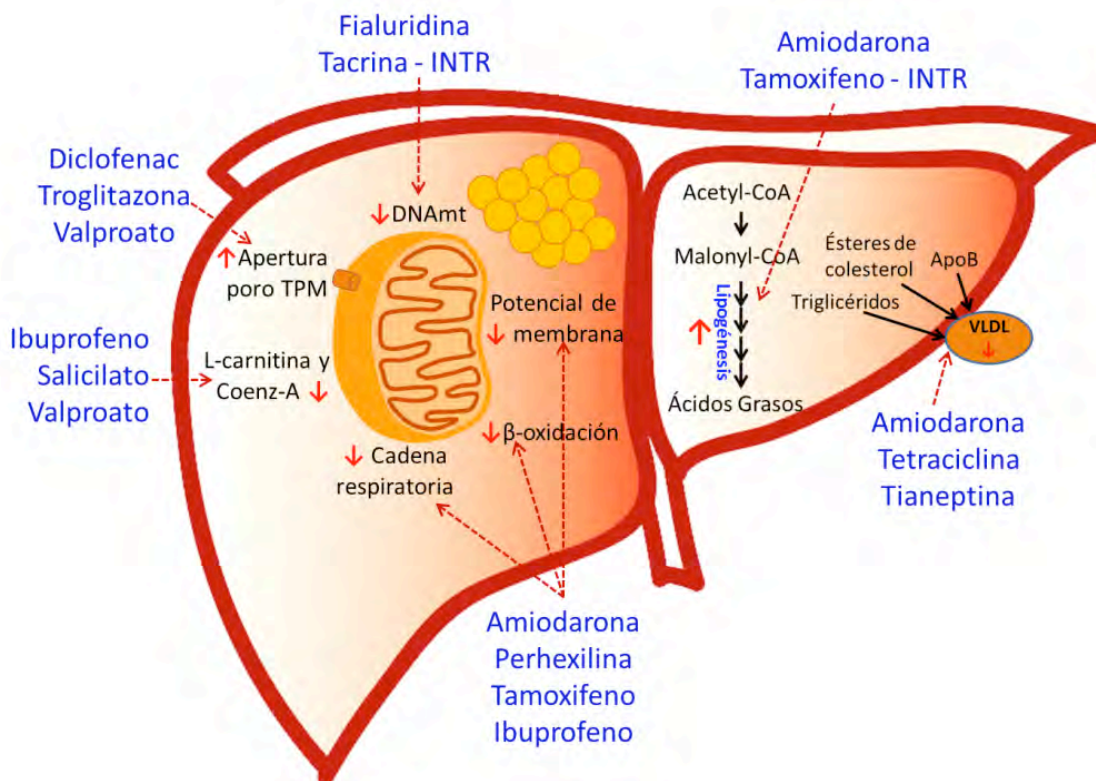
A nivel molecular, la esteatosis hepática no alcohólica y su progresión a esteatohepatitis son el resultado de una infinidad de mecanismos patogénicos (8). Por esta razón, los pacientes con EHGNA son un grupo heterogéneo en el que la progresión y la respuesta a la terapia son a menudo imprevisibles y variables; debido seguramente a las numerosas influencias ambientales (estilo de vida, enfermedad, fármacos, etc.) y sus interacciones con sutiles variaciones genéticas (9). La EHGNA más estudiada por su alta prevalencia es la EHGNA asociada al síndrome metabólico, que tiene sus orígenes en la sobrealimentación y la hipoactividad (3-6). Sin embargo, mucha menos atención se ha prestado a la EHGNA iatrogénica, que es causada, promovida o exacerbada por los medicamentos (8, 10).

### 1.3. EHGNA iatrogénica: mecanismos

Se estima que sólo un 2 % de los fármacos comercializados desempeñan un papel etiológico directo en la EHNA (10). Sin embargo, es probable que muchos otros fármacos puedan exacerbar o precipitar la esteatosis en presencia de determinados factores de riesgo y condiciones patológicas (11), como son las propias del síndrome metabólico.

Para muchos fármacos investigados, el mecanismo de esteatosis sugerido se ha relacionado con vías de metabolismo energético y orgánulos asociados. Diversos medicamentos han mostrado un marcado efecto negativo en la beta-oxidación mitocondrial de los AG, bien por la inhibición directa de enzimas específicas (12), o indirectamente por secuestrar cofactores de esta vía o por inhibir enzimas para el transporte de AG a la mitocondria (13). En general, los fármacos que afectan la cadena respiratoria, la apertura de poro de transición de permeabilidad o el potencial transmembrana causan disfunción mitocondrial e, indirectamente, inhibición de la beta-oxidación de los AG (14, 15). Otros medicamentos pueden aumentar la síntesis *de novo* de AG y la síntesis de TG. La inhibición de la actividad de la MTTP, una enzima clave en la formación y secreción de VLDLs, se ha propuesto también como un mecanismo para algunos medicamentos esteatósicos (16, 17) (**Figura 1**).





**Figura 1. Mecanismos implicados en el desarrollo de la esteatosis por medicamentos.** Los fármacos esteatóticos pueden inhibir la función mitocondrial y la síntesis y secreción de VLDLs; y activar las vías lipogénicas, conduciendo a la acumulación de grasa en el hígado. Otros mecanismos, no mostrados en la figura, implicarían la desregulación transcripcional y post-transcripcional (miRNAs) de genes del metabolismo lipídico. (INTR: inhibidores análogos de los nucleósidos de la transcriptasa reversa).

Con la llegada de las "-ómicas" se han desarrollado nuevas estrategias para investigar los mecanismos de toxicidad y proponer firmas y biomarcadores predictivos. En este sentido, varios estudios han investigado el efecto de fármacos esteatóticos bien caracterizados en el perfil de expresión génica en hígado de ratón (18-22). Sin embargo, cada uno de estos estudios se centró en un fármaco esteatótico particular y no determinó si los fármacos de este grupo tenían un efecto común (una biofirma). Lo que sí demostraron estos estudios fue que los fármacos esteatóticos (que supuestamente actúan por perturbación directa de rutas metabólicas o daño a la mitocondria) también fueron capaces de producir efectos muy llamativos en el transcriptoma (niveles de RNA) del hígado de ratón. De hecho, el número de RNAs alterado por estos fármacos esteatóticos fue muy elevado: 96 con tetraciclina (22), 414 con tamoxifeno (20), 908 con metotrexato (19) y 1910 / 1325 con valproato agudo / crónico (18, 21). El mecanismo molecular que subyace a estas profundas alteraciones en la expresión génica no se ha investigado. Podría ser un mecanismo causal desencadenado por los fármacos esteatóticos o una secuela secundaria, pero en cualquier caso es muy probable que la inhibición / activación de factores de transcripción y/o mecanismos epigenéticos (ej. microRNAs) sean una de las razones de esta marcada perturbación transcriptómica.

Nosotros hemos investigado estas hipótesis, incubando células hepáticas humanas con fármacos esteatóticos

modelo (tetraciclina, valproato, amiodarona y tianeptina) y con compuestos control no esteatóticos (amitriptilina, ketotifen y citrato). Hemos determinado la expresión de factores de transcripción (mRNA) y microRNAs implicados en metabolismo energético, y hemos comprobado con sorpresa que los compuestos esteatóticos causan una perturbación muy importante en los niveles de expresión de estos genes (23, 24). Estos resultados refuerzan la idea de que los compuestos esteatóticos alteran vías primarias de regulación génica y generan una huella característica en los perfiles transcriptómicos de mRNA y miRNA. El mecanismo subyacente a este proceso no ha sido investigado todavía. Su estudio permitiría descifrar nuevos mecanismos moleculares y nuevas aproximaciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas.

#### 1.4. Identificación de fármacos esteatóticos en investigación pre-clínica

La hepatotoxicidad (en general) y la esteatosis hepática (en particular) son una causa importante de fracaso en el desarrollo preclínico y clínico de medicamentos, y es la razón más citada de los "black box warnings" y de la retirada de fármacos aprobados (25). Por lo tanto, la detección de fármacos esteatóticos y el desarrollo de ensayos fiables que permita la identificación de estas moléculas son cuestiones clave en las primeras etapas de desarrollo farmacéutico.



Los ensayos *in vitro* que evalúan el potencial esteatóticos de nuevos medicamentos son limitados (17, 26). El ensayo predictivo *in vitro* más popular consiste en medir la acumulación de lípidos neutros en las células cultivadas. Las sondas fluorescentes como Rojo Nilo o Bodipy 493/503 son aproximaciones simples para identificar compuestos que inducen esteatosis (15, 27, 28). Sin embargo, no proporcionan información sobre el mecanismo. Además, su sensibilidad es baja y requiere el uso de plataformas tecnológicas difíciles de implementar en cribados de alto rendimiento, como la citometría de flujo o la microscopía y el análisis de imagen. Tampoco son métodos extrapolables a la práctica clínica.

Nuestras resultados en células hepáticas humanas en cultivo (23, 24) y los estudios publicados con modelos animales (18-22) indican que los fármacos esteatóticos alteran vías de regulación transcripcional singulares y generan una huella característica en el perfil de muchos genes que podría tener utilidad para entender mejor su mecanismo patogénico y para prevenir o detectar nuevos compuestos o fármacos con este potencial. En este sentido, hemos propuesto un ensayo, basado en la medida de los niveles de mRNA de 3 de estos genes (FOXA1, SREBP1c y HEX), que tiene una elevada sensibilidad y especificidad para detectar fármacos esteatóticos (23). Este ensayo podría utilizarse como método de cribado rápido y de alto rendimiento en la investigación preclínica de medicamentos, ya que tiene la ventaja de ser más sensible que los ensayos basados en parámetros bioquímicos o morfológicos y, desde el punto de vista técnico, es más fácil de implementar.

### *1.5. Diagnóstico de esteatosis iatrogénica en la práctica clínica*

La lesión inducida por medicamentos se considera un evento poco frecuente, pero está probablemente subestimada debido a la falta de sistemas de vigilancia y sistemas fiables de reconocimiento y diagnóstico. De hecho, la extrapolación a partir de registros prospectivos bien elaborados indica que los casos reales son 16 veces superiores a los detectados, y que la lesión inducida por medicamentos es probablemente una causa común de insuficiencia hepática aguda grave y potencialmente fatal (~44,000 casos anuales de hepatotoxicidad en EEUU que causan al menos 2700 muertes) (29).

Los enfermos con síndrome metabólico, generalmente crónicos y de edad avanzada, son más susceptibles a las reacciones adversas debido a las terapias combinadas, las altas dosis y los largos períodos de administración. Son particularmente preocupantes las terapias combinadas agresivas para disminuir los riesgos asociados con este síndrome. Por ejemplo, estatinas, niacina y fibratos, para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, junto con tiazolidinedionas, para la diabetes, y tiazidas y bloqueadores del sistema renina-angiotensina, para el control de la presión arterial (30, 31).

¿Cuál es la contribución de estos cócteles farmacológicos a la esteatosis hepática de estos pacientes?

La posibilidad de que estas combinaciones de fármacos contribuyan al hígado graso en pacientes con síndrome metabólico no ha sido valorada todavía. Sin embargo, estudios previos sugieren que muchos de estos fármacos pueden causar daño directo en el hígado. Encontramos, por ejemplo, casos de hepatotoxicidad y/o esteatosis causada por hipolipemiantes (32, 33), medicamentos para la obesidad (34), antidiabéticos orales (35, 36), antihipertensivos (37), etc. Estas consideraciones permiten postular que la combinación de estos fármacos en pacientes con propensión a la esteatosis puede contribuir a dicha esteatosis, y promover la lesión hepática y el avance de la EHGNA. Sin embargo, no existe ningún método diagnóstico en la práctica clínica habitual para identificar la EHGNA específica por medicamentos. Por ello, el desarrollo de un método que permita identificar la esteatosis iatrogénica en pacientes con síndrome metabólico permitiría, en los pacientes identificados, el uso de terapias combinadas más racionales y la prescripción de fármacos alternativos que no potencien su condición patológica.

El diagnóstico de esteatosis iatrogénica mediante una huella basada en niveles de mRNAs intracelulares requeriría tejido hepático y, por lo tanto, no sería un procedimiento recomendado para pacientes. Para abordar este método diagnóstico serían necesarios marcadores liberados al torrente circulatorio. Nuestros resultados demuestran que los medicamentos esteatóticos alteran múltiples factores de transcripción en los hepatocitos y estos han de afectar, a su vez, a la expresión de múltiples genes diana; entre ellos: 1) genes codificantes de enzimas del metabolismo energético del hepatocito; y 2) genes de RNAs no codificantes, como los miRNAs, de los que algunos serán exportados al torrente circulatorio, donde podrán ser identificados como una huella mirnómica (de miRNAs).

Los miRNAs circulantes son relativamente estables y tienen un gran potencial como biomarcadores de enfermedad. La evidencia sugiere que los miRNAs se exportan selectivamente por múltiples tipos celulares (incluido el hígado (38)) con distintas firmas que se han encontrado alteradas en muchas patofisiologías. Los miRNAs circulantes son transportados en vesículas derivadas de membrana (exosomas y micropartículas), en lipoproteínas y en complejos con otras proteínas, como Argo2 (39-41). Nuestros resultados recientes apoyan el uso de miRNAs como biomarcadores no invasivos de esteatosis por fármacos. En primer lugar, hemos detectado que los fármacos esteatóticos modelo inducen selectivamente varios miRNAs en cultivos de hepatocitos. Además, algunos de estos miRNAs se detectaron fácilmente en el torrente circulatorio (24). Por otra parte hemos demostrado que varios de los fármacos de uso común en los enfermos con EHGNA (ej: irbesartan, metformina, fenofibrato, omeprazol) son capaces de inducir estos mismos miRNAs y de inducir la esteatosis en cultivos celulares. Esto nos indicaría que una parte de la acumulación grasa en los enfermos con EHGNA está

promovida por los fármacos que toman. Como prueba de que esta posibilidad es real, hemos medido miRNA séricos en enfermos que se medican con fibratos y hemos comprobado que estos miRNAs biomarcadores están aumentados y que el nivel de esteatosis en la biopsia hepática es superior que el observado en los enfermos que no toman fibratos (24). Demostramos así, por primera vez, que determinados miRNAs pueden servir para un diagnóstico diferencial (no invasivo) de la esteatosis iatrogénica.

## 2. COLESTASIS INDUCIDA POR MEDICAMENTOS

### 2.1. ¿Qué es la colestasis?

La colestasis se define como la reducción o el bloqueo del flujo biliar normal como consecuencia de una alteración del transporte y/o excreción de la bilis impidiendo, total o parcialmente, su llegada al duodeno. Es un síndrome clínico y bioquímico caracterizado por niveles elevados de ácidos biliares (AB) y bilirrubina en sangre, ictericia, prurito y elevación sérica de enzimas hepáticas, en particular la fosfatasa alcalina (ALP). Si el origen de la colestasis radica en el hepatocito o en el árbol biliar del interior del parénquima hepático, la colestasis recibe el nombre de intrahepática; por el contrario, si la obstrucción se encuentra en las vías biliares externas del hígado recibe el nombre de extrahepática. Por su aparición y mantenimiento en el tiempo, la colestasis también se clasifica en aguda y crónica. La ictericia constituye el signo clínico más evidente de las colestasis, consecuencia de la acumulación de bilirrubina en el organismo, lo que confiere a la piel y a las mucosas una coloración amarillenta característica.

### 2.2. Colestasis iatrogénica por fármacos

El hígado es un órgano potencialmente vulnerable a los fármacos debido a su ubicación anatómica y a la elevada expresión de transportadores que facilitan la acumulación de medicamentos en los hepatocitos. La lesión hepática inducida por fármacos (*Drug Induced Liver Injury*, DILI) es la causa más común de insuficiencia o fallo hepático agudo (42), así como de mortalidad causada por medicamentos. Además, es una de las principales razones de interrupción en el desarrollo de nuevos fármacos. En la praxis clínica se utilizan criterios de consenso basados en parámetros analíticos (ALT y ALP séricas elevadas y la relación entre ambas) para clasificar la hepatotoxicidad en hepatocelular ( $ALT/ALP \geq 5$ ), colestásica ( $ALT/ALP \leq 2$ ) y mixta ( $2 < ALT/ALP < 5$ ) (43).

El primer estudio poblacional sobre la incidencia de DILI se llevó a cabo en Francia y reveló una incidencia de 14 casos por cada 100.000 habitantes por año (43). Dentro de los episodios de DILI la prevalencia de la colestasis es bastante elevada y oscila entre el 15 y el 50 %: En el estudio francés se encontró un patrón colestásico (puro o mixto) en el 33 % de los casos de DILI (43). De los 784 casos examinados por el comité asesor de DILI sueco entre 1970 y 2004, casi el 50 % tuvieron hepatotoxicidad

colestásica o mixta (44). La colestasis aguda supuso aproximadamente el 16 % de los 1100 casos de DILI evaluados en un estudio danés entre 1978 y 1987 (45). En los Estados Unidos, los medicamentos fueron responsables de aproximadamente el 20 % de los casos de ictericia en la población anciana (46). En el registro de hepatotoxicidad español se anotaron 650 casos de DILI ente 1994 y 2007, de los que entre el 48 % (hombres) y el 43 % (mujeres) se clasificaron como hepatitis colestásica o mixta (47). Pese a la importancia de las cifras, se cree que los casos registrados podrían ser sólo una pequeña fracción de todas las colestasis por fármacos, debido a su difícil diagnóstico, basado tan sólo en la sospecha de un agente causal (fármaco) y en una elevación de enzimas hepáticas. Por ello, es posible que el número real de casos y los costes socio sanitarios asociados superen lo estimado para esta patología (48).

La colestasis iatrogénica es una respuesta idiosincrásica que afecta a una fracción de los pacientes que toman el medicamento causal (49), y cuyos mecanismos subyacentes son con mucha frecuencia desconocidos. En muchos pacientes la recuperación es razonablemente rápida tras la interrupción de la administración de la medicación sospechosa. Sin embargo, en otros, la resolución es notablemente más lenta, adquiriendo tintes de colestasis crónica (50). En un estudio reciente de seguimiento de DILI se observó que en pacientes en los que los parámetros bioquímicos persistían elevados tras 12 meses, la colestasis iatrogénica era la manifestación predominante (51). Estos casos crónicos vienen acompañados de sintomatología más invalidante para el paciente (prurito difícil de tratar), requiriendo tratamiento con MARS (*Molecular Adsorbent Recirculating System*) y teniendo más probabilidad de evolucionar a enfermedad hepática crónica (52, 53). Sorprendentemente, la base molecular de esta cronicidad es desconocida y quedan muchas cuestiones por resolver: ¿Se acumula el fármaco en el organismo por un bloqueo en su eliminación? ¿Es por una alteración severa de los mecanismos reguladores, que no se resuelven tras la retirada del fármaco? ¿Es por la activación de una respuesta inflamatoria, inducida por altos niveles de AB, que se auto-perpetúa? (54, 55).

También es importante destacar que no existen marcadores específicos para predecir o anticipar el tipo de respuesta colestásica y su severidad. La medida de las concentraciones séricas de AB podría aportar mucho al diagnóstico y pronóstico de estos pacientes. Actualmente, la ictericia es posiblemente el único factor pronóstico de gravedad para los casos de DILI ya que se asocia con una mayor tasa de mortalidad o necesidad de trasplante de hígado (Ley de Hy:  $ALT > 3 \text{ ULN} + \text{bilirrubina} > 2 \text{ ULN}$ ) (56). Esta tasa oscila entre el 9 % y el 12 % según tres estudios de grandes series de pacientes en los Estados Unidos, España y Suecia (57-59). El pronóstico es mejor para el DILI colestásico, en comparación con el hepatocelular, en base a los datos de España y Suecia, pero ocurre lo contrario en los registros de los Estados Unidos.

Además de fármacos, hay otros compuestos y remedios herbales que también pueden desencadenar una colestasis iatrogénica. El uso ilícito de esteroides anabolizantes es una causa creciente de DILI con colestasis que puede conducir a lesión hepática y renal grave. Estos pacientes presentan un fenotipo distinto caracterizado por elevaciones considerables y muy persistentes de bilirrubina conjugada en suero (60).

La lesión o daño hepatocelular que en ocasiones también se produce en el transcurso de la colestasis iatrogénica puede deberse a los fármacos (y/o sus metabolitos), a los propios AB, o por una combinación de ambos. Los AB pueden ser citotóxicos cuando alcanzan altas concentraciones en los hepatocitos. Su toxicidad está directamente relacionada con su hidrofobicidad, y sigue el siguiente orden: LCA > CDCA, DCA > CA > UDCA (61). En condiciones normales, la concentración de los AB libres en el citosol es baja debido su unión a proteínas citosólicas. Sin embargo, si las concentraciones de AB exceden la capacidad de unión, puede aparecer daño mitocondrial y en última instancia apoptosis o necrosis hepatocelular (62) o del ducto biliar (63). Un razonamiento similar puede aplicarse a los fármacos causantes del DILI. Su excreción biliar puede verse disminuida, pudiendo acumularse en el citosol y causar citotoxicidad por mecanismos hepatotóxicos clásicos.

### 2.3. Transportadores biliares

Para entender los mecanismos implicados en la colestasis iatrogénica es importante comprender primero los principios del flujo biliar que está fundamentalmente mediado por los transportadores del sistema enterohepático.

La síntesis de AB a partir de colesterol se realiza en los hepatocitos e implica a más de 15 enzimas, entre los que destaca la colesterol-7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1), enzima limitante de la ruta biosintética mayoritaria. Los AB primarios en humanos son el cólico (CA) y el chenodesoxicólico (CDCA), que en el intestino son transformados por la microbiota en los AB secundarios desoxicólico (DCA) y litocólico (LCA). Más del 95 % de los AB se conjugan en el hígado con glicina y taurina, aunque en determinadas circunstancias también pueden ser sulfatados o glucoronidados. Los AB conjugados son más hidrosolubles, menos tóxicos, y más fácilmente excretados por heces y orina (64).

Los AB son transportados desde el sinusoides hacia el canalículo biliar de un modo vectorial por los transportadores de la membrana basolateral/sinusoidal (fundamentalmente NTCP y OATPs) y los de la membrana canalicular (BSEP y MRP2). En esta membrana también encontramos el transportador MDR3/4 que es crítico para el transporte de fosfolípidos y el ABCG5/8, responsable del transporte del colesterol biliar. Los hepatocitos también pueden bombear AB por la membrana basolateral para devolverlos al torrente circulatorio, una actividad mediada por MRP3, MRP4 y OSTa/b. Las enzimas implicadas en el metabolismo de los AB son las de conjugación con glicina

y taurina (BAAT), con sulfato (SULT2A1) o con ácido glucurónico (UGT2B4 y otras UGTs). Además para evitar su toxicidad y aumentar su solubilidad pueden ser hidroxilados por distintos CYPs como los CYP3As y CYP2Bs. En el epitelio intestinal destaca la presencia del transportador ASBT que es crucial para la recaptación de los AB y su flujo enterohepático. Aquí se reabsorben y se devuelven a la circulación portal hacia el hígado un 95 % de los AB que llegan desde la vesícula biliar. Sólo el 5 % se excretan por las heces (64).

La bilirrubina, el pigmento de degradación del hemo, es transportada por el torrente circulatorio unida a la albúmina hasta los hepatocitos. La captación, a través de la membrana basolateral, podría ser por difusión pasiva y/o facilitada por transportadores OATP1Bs. En el retículo endoplasmático, es conjugada por la UGT1A1 con ácido glucurónico y finalmente es excretada al canalículo por el transportador MRP2 y también, en menor medida, por ABCG2/BCRP1 (65).

Los AB no sólo tienen importantes propiedades en la función digestiva para la absorción de las grasas y las vitaminas liposolubles en el intestino. Recientemente se ha descubierto su papel como moléculas señalizadoras, capaces de regular múltiples procesos metabólicos e inflamatorios, entre otros, y se están desarrollando diversos fármacos, derivados de AB, para enfermedades hepáticas como la EHNA, la cirrosis biliar primaria (CBP) y la fibrosis. Por ello es importante también tener en cuenta la regulación del metabolismo y transporte de AB ya que su alteración puede tener múltiples efectos negativos. En la regulación de estos procesos participan numerosos receptores nucleares, muchos de ellos capaces de unirse y activarse por AB como FXR, PXR y VDR. También están implicados CAR, SHP, LRH1, HNF4a, LXRA, PPARs, etc. Además, hay otros reguladores importantes de otras familias como TGR5 y FGF15/19 (66).

A diferencia de las colestasis asociadas a la CBP o a la colangitis esclerosante, donde los mecanismos subyacentes están bien caracterizados, en la colestasis inducida por fármacos los aspectos mecanísticos y causales apenas son conocidos.

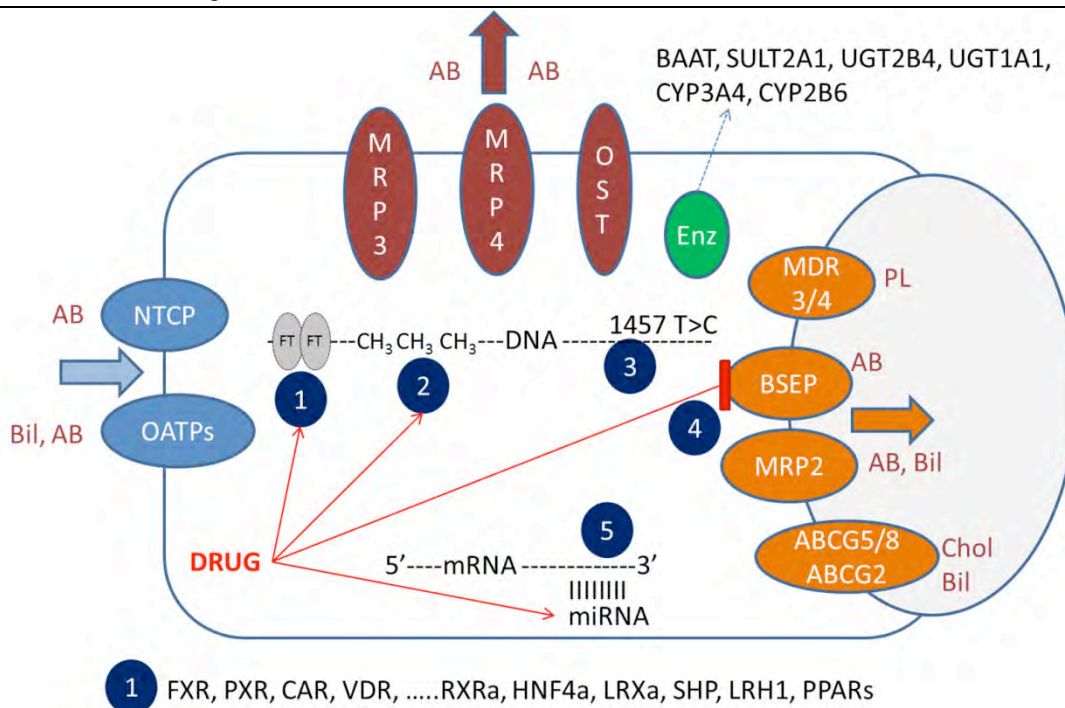
### 2.4. Mecanismos moleculares en la colestasis por medicamentos

Diversos estudios han asociado la inhibición directa de transportadores canaliculares como BSEP o variantes polimórficas de los mismos, con la colestasis inducida por fármacos. Se sabe, por ejemplo, que muchos medicamentos pueden inhibir directamente a BSEP en sistemas in vitro (vesículas de membranas de células Sf9 con BSEP expresado por baculovirus) (67). Pero si este mecanismo de inhibición directa fuera determinante en humanos, ¿por qué no ocurre en todos los pacientes? Hay necesariamente que pensar en diferencias interindividuales que hagan susceptibles sólo a una parte de la población. Y así, por ejemplo, existe un polimorfismo de BSEP, 1331T>C, que constituye un factor de riesgo potencial

(68). Sin embargo, este alelo tiene una frecuencia alrededor del 50 %, lo que no se corresponde con la baja frecuencia del DILI colestásico. Además, otros estudios no han encontrado asociaciones entre esta variante polimórfica y el DILI colestásico (69, 70). Por último, el análisis de un pequeño banco de hígados reveló una gran variabilidad interindividual en la expresión de BSEP (19 veces en mRNA y 31 veces en proteína) (71), que no se puede explicar sólo por las variantes polimórficas (68). Estos resultados concuerdan con datos preliminares de nuestro laboratorio, en un cohorte mayor de pacientes, que muestran variaciones en el nivel de mRNA de BSEP de hasta 100 veces. Sin embargo, quedan bastantes cuestiones por resolver: ¿Cuáles son los transportadores más variables en la población? ¿Existen individuos con fenotipos de riesgo?

Las evidencias existentes hasta ahora sugieren que las variantes alélicas de los transportadores no puede explicar por sí mismas la idiosincrasia de la colestasis por fármacos, por lo que es muy probable que existan mecanismos reguladores y epigenéticos adicionales que contribuyan de forma más importante a esta variabilidad.

En este sentido, hay que señalar que nuestro grupo ha demostrado, en hepatocitos de rata en sándwich de colágeno, que la mayoría de fármacos colestásicos afectan muy significativamente la expresión (mRNA) de los transportadores de AB (NTCP, BSEP, OATP1A1, MRP2) (72). De nuevo, los mecanismos subyacentes son desconocidos, pero ciertamente, en esas condiciones experimentales, las variantes alélicas o la inhibición directa de los transportadores no serían mecanismos plausibles. Antes bien, sería más lógico pensar que los fármacos colestásicos pueden alterar la regulación transcripcional y/o epigenética de los transportadores. Los mecanismos reguladores también podrían explicar la variabilidad interindividual y la respuesta idiosincrásica. Esta hipótesis no se ha explorado nunca en relación con la colestasis iatrogénica. La alteración de la expresión de los transportadores inducida por fármacos podría tener su origen en a) la represión/inhibición de factores de transcripción activadores, b) la inducción de microRNAs inhibidores, o c) la alteración de la metilación de los genes implicados (**Figura 2**).



**Figura 2. Mecanismos implicados en la colestasis por medicamentos.** 1) Alteración de la actividad de los factores de transcripción encargados de la regulación de los genes de transporte y metabolismo de la bilis. 2) Alteraciones epigenéticas mediadas por los fármacos en la metilación del DNA y en la condensación de la cromatina. 3) Polimorfismos genéticos (variabilidad y susceptibilidad). 4) Inhibición directa de los transportadores por los medicamentos colestásicos. 5) Inducción/represión de microRNAs que regulan la expresión (mRNA → Prot) de los genes de transporte y metabolismo de la bilis.

2.5. ¿Hay tratamiento para la colestasis por fármacos?

En la actualidad no existe un consenso para el tratamiento clínico de los pacientes con colestasis iatrogénica. El UDCA (ácido ursodesoxicólico) es un AB altamente soluble y no tóxico, que ha sido aprobado para uso terapéutico para la disolución de cálculos biliares y para el tratamiento paliativo de la CBP. El UDCA parece

reducir la citotoxicidad del conjunto de los AB, protege a los colangiocitos, estimula la secreción hepatobiliar, tiene actividad antioxidante e inhibe la apoptosis de los hepatocitos (61). El UDCA también podría activar al PXR e inducir la expresión de sus genes diana, CYP3A4, SULTs, UGTs, BSEP, MDR3 y MRP4, facilitando la detoxificación de los AB (73). El ácido norursodesoxicólico (norUDCA) es un homólogo del UDCA

que no puede ser conjugado, se secreta en la bilis, se reabsorbe por los colangiocitos y vuelve al hígado. Esta circulación cole-hepática conduce a un aumento de bicarbonato en la bilis e induce hipercolelisis. De este modo, el norUDCA revierte la colangitis esclerosante en el modelo Mdr2-/- (ABCB4) de colangiopatía (73). Por último, el ácido obeticolico (OCA, 6ethyl-CDCA o INT-747) es un agonista potente y selectivo del FXR (74). En estudios con animales, el OCA aumenta la sensibilidad a la insulina, inhibe la gluconeogénesis, inhibe la lipogénesis, y también tiene propiedades anti-inflamatorias y anti-fibróticas (74). En estudios clínicos de pacientes con CBP, el OCA redujo significativamente la ALP. Sin embargo, la mayoría de los pacientes desarrollaron prurito, un síntoma común de la colestasis y un efecto secundario habitual en las terapias con AB (73).

### 3. CONCLUSIONES

La esteatosis y la colestasis por fármacos son el resultado de múltiples mecanismos, siendo la alteración de la regulación transcripcional una vía potencial adicional que debe investigarse, ya que permitiría un mejor conocimiento de la hepatotoxicidad y la posibilidad de desarrollar nuevas herramientas diagnósticas que complementen a las actuales.

### 4. BIBLIOGRAFÍA

- Canbay A, Bechmann L, Gerken G. Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol* 2007;45:35-41.
- Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology* 2013;48:434-441.
- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011;332:1519-1523.
- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99-S112.
- Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleveland Clinic journal of medicine* 2008;75:721-728.
- Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology* 2005;16:421-427.
- Ramesh S, Sanyal AJ. Hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in liver disease* 2004;24:399-413.
- Larrain S, Rinella ME. A myriad of pathways to NASH. *Clinics in liver disease* 2012;16:525-548.
- Anstee QM, Daly AK, Day CP. Genetics of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in liver disease* 2011;31:128-146.
- Grieco A, Forgione A, Miele L, Vero V, Greco AV, Gasbarrini A, et al. Fatty liver and drugs. *European review for medical and pharmacological sciences* 2005;9:261-263.
- Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *Journal of clinical pathology* 2009;62:481-492.
- Begrache K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of hepatology* 2011;54:773-794.
- Aires CC, Ijlst L, Stet F, Prip-Buus C, de Almeida IT, Duran M, et al. Inhibition of hepatic carnitine palmitoyl-transferase I (CPT IA) by valproyl-CoA as a possible mechanism of valproate-induced steatosis. *Biochemical pharmacology* 2010;79:792-799.
- Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacology & therapeutics* 1995;67:101-154.
- Donato MT, Gomez-Lechon MJ. Drug-induced liver steatosis and phospholipidosis: cell-based assays for early screening of drug candidates. *Current drug metabolism* 2012;13:1160-1173.
- Letteron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 2003;38:133-140.
- Amacher DE. The mechanistic basis for the induction of hepatic steatosis by xenobiotics. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2011;7:949-965.
- Lee MH, Hong I, Kim M, Lee BH, Kim JH, Kang KS, et al. Gene expression profiles of murine fatty liver induced by the administration of valproic acid. *Toxicology and applied pharmacology* 2007;220:45-59.
- Lee MH, Hong I, Kim M, Lee BH, Kim JH, Kang KS, et al. Gene expression profiles of murine fatty liver induced by the administration of methotrexate. *Toxicology* 2008;249:75-84.
- Lee MH, Kim JW, Kim JH, Kang KS, Kong G, Lee MO. Gene expression profiling of murine hepatic steatosis induced by tamoxifen. *Toxicology letters* 2010;199:416-424.
- Lee MH, Kim M, Lee BH, Kim JH, Kang KS, Kim HL, et al. Subchronic effects of valproic acid on gene expression profiles for lipid metabolism in mouse liver. *Toxicology and applied pharmacology* 2008;226:271-284.
- Yin HQ, Kim M, Kim JH, Kong G, Lee MO, Kang KS, et al. Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline. *Toxicological sciences* 2006;94:206-216.
- Benet M, Moya M, Donato MT, Lahoz A, Hervas D, Guzman C, et al. A simple transcriptomic signature able to predict drug-induced hepatic steatosis. *Archives of toxicology* 2014;88:967-982.
- Lopez-Riera M, Conde I, Tolosa L, Zaragoza A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, et al. New microRNA Biomarkers for Drug-Induced Steatosis and Their Potential to Predict the Contribution of Drugs to Non-

- alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in pharmacol* 2017;8:3.
25. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR, et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of toxicology* 2006;80:580-604.
  26. Amacher DE. Strategies for the early detection of drug-induced hepatic steatosis in preclinical drug safety evaluation studies. *Toxicology* 2011;279:10-18.
  27. Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, Negro A, Herrera G, Castell JV, et al. Cytometric analysis for drug-induced steatosis in HepG2 cells. *Chemico-biological interactions* 2009;181:417-423.
  28. Donato MT, Tolosa L, Jimenez N, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. High-content imaging technology for the evaluation of drug-induced steatosis using a multiparametric cell-based assay. *J Biomol Screen* 2012;17:394-400.
  29. Bell LN, Chalasani N. Epidemiology of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Seminars in liver disease* 2009;29:337-347.
  30. Rembold CM. Combination therapy of dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Current diabetes reports* 2004;4:330-334.
  31. Kim-Mitsuyama S. Combination therapy of angiotensin receptor blocker with statin or thiazolidinediones as promising therapeutic strategy for metabolic syndrome and atherosclerosis. *Hypertension research* 2009;32:639-640.
  32. Parra JL, Reddy KR. Hepatotoxicity of hypolipidemic drugs. *Clinics in liver disease* 2003;7:415-433.
  33. Chalasani N. Statins and hepatotoxicity: focus on patients with fatty liver. *Hepatology* 2005;41:690-695.
  34. Ghali P, Lindor KD. Hepatotoxicity of drugs used for treatment of obesity and its comorbidities. *Seminars in liver disease* 2004;24:389-397.
  35. Masubuchi Y. Metabolic and non-metabolic factors determining troglitazone hepatotoxicity: a review. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2006;21:347-356.
  36. Dourakis SP, Tzemanakis E, Sinani C, Kafiri G, Hadziyannis SJ. Gliclazide-induced acute hepatitis. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2000;12:119-121.
  37. Da Silva GH, Alves AV, Duques P, Seva-Pereira T, Soares EC, Escanhoela CA. Acute hepatotoxicity caused by enalapril: a case report. *Journal of gastrointestinal and liver diseases* 2010;19:187-190.
  38. Wang XW, Heegaard NH, Orum H. MicroRNAs in liver disease. *Gastroenterology* 2012;142:1431-1443.
  39. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:5003-5008.
  40. Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013;33:186-192.
  41. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* 2011;13:423-433.
  42. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003;349:474-485.
  43. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology* 2002;36:451-455.
  44. Bjornsson ES, Bergmann OM, Bjornsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology* 2013;144:1419-1425, 1425 e1411-1413; quiz e1419-1420.
  45. Friis H, Andreasen PB. Drug-induced hepatic injury: an analysis of 1100 cases reported to the Danish Committee on Adverse Drug Reactions between 1978 and 1987. *J Intern Med* 1992;232:133-138.
  46. Lewis JH. Drug-induced liver disease. *Med Clin North Am* 2000;84:1275-1311, x.
  47. Lucena MI, Andrade RJ, Kaplowitz N, Garcia-Cortes M, Fernandez MC, Romero-Gomez M, et al. Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex. *Hepatology* 2009;49:2001-2009.
  48. Yang K, Kock K, Sedykh A, Tropsha A, Brouwer KL. An updated review on drug-induced cholestasis: mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. *J Pharm Sci* 2013;102:3037-3057.
  49. Padda MS, Sanchez M, Akhtar AJ, Boyer JL. Drug-induced cholestasis. *Hepatology* 2011;53:1377-1387.
  50. Andrade RJ, Lucena MI, Kaplowitz N, Garcia-Munoz B, Borraz Y, Pachkoria K, et al. Outcome of acute idiosyncratic drug-induced liver injury: Long-term follow-up in a hepatotoxicity registry. *Hepatology* 2006;44:1581-1588.
  51. Fontana RJ, Hayashi PH, Barnhart H, Kleiner DE, Reddy KR, Chalasani N, et al. Persistent liver biochemistry abnormalities are more common in older patients and those with cholestatic drug induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 2015;110:1450-1459.
  52. Diaz FC, Saez-Gonzalez E, Benlloch S, Alvarez-Sotomayor D, Conde I, Polo B, et al. Albumin dialysis with MARS for the treatment of anabolic steroid-induced cholestasis. *Ann Hepatol* 2016;15:939-943.
  53. Wittebole X, Hantson P. Use of the molecular adsorbent recirculating system (MARS) for the

- management of acute poisoning with or without liver failure. *Clin Toxicol (Phila)* 2011;49:782-793.
54. Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *The American journal of pathology* 2011;178:175-186.
  55. Cai SY, Ouyang X, Chen Y, Soroka CJ, Wang J, Mennone A, et al. Bile acids initiate cholestatic liver injury by triggering a hepatocyte-specific inflammatory response. *JCI Insight* 2017;2:e90780.
  56. Reuben A. Hy's law. *Hepatology* 2004;39:574-578.
  57. Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC, Pelaez G, Pachkoria K, Garcia-Ruiz E, et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* 2005;129:512-521.
  58. Bjornsson ES, Jonasson JG. Drug-induced cholestasis. *Clin Liver Dis* 2013;17:191-209.
  59. Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Davern T, Serrano J, et al. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology* 2008;135:1924-1934, 1934 e1921-1924.
  60. Robles-Diaz M, Gonzalez-Jimenez A, Medina-Caliz I, Stephens C, Garcia-Cortes M, Garcia-Munoz B, et al. Distinct phenotype of hepatotoxicity associated with illicit use of anabolic androgenic steroids. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:116-125.
  61. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 2009;15:1677-1689.
  62. Roberts LR, Kurosawa H, Bronk SF, Fesmier PJ, Agellon LB, Leung WY, et al. Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1997;113:1714-1726.
  63. Fickert P, Fuchsbichler A, Marschall HU, Wagner M, Zollner G, Krause R, et al. Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice. *Am J Pathol* 2006;168:410-422.
  64. Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol* 2013;58:155-168.
  65. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World J Gastroenterol* 2013;19:6398-6407.
  66. Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol* 2009;156:7-27.
  67. Morgan RE, Trauner M, van Staden CJ, Lee PH, Ramachandran B, Eschenberg M, et al. Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development. *Toxicol Sci* 2010;118:485-500.
  68. Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, Klein K, Schaeffeler E, Nussler AK, et al. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology* 2006;44:62-74.
  69. Kagawa T, Hirose S, Arase Y, Oka A, Anzai K, Tsuruya K, et al. No contribution of the ABCB11 p.444A polymorphism in Japanese patients with drug-induced cholestasis. *Drug Metab Dispos* 2015;43:691-697.
  70. Ulzurrun E, Stephens C, Crespo E, Ruiz-Cabello F, Ruiz-Nunez J, Saenz-Lopez P, et al. Role of chemical structures and the 1331T>C bile salt export pump polymorphism in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Liver Int* 2013;33:1378-1385.
  71. Ho RH, Leake BF, Kilkenny DM, Meyer Zu Schwabedissen HE, Glaeser H, Kroetz DL, et al. Polymorphic variants in the human bile salt export pump (BSEP; ABCB11): functional characterization and interindividual variability. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20:45-57.
  72. Donato MT, Lopez-Riera M, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Jover R. Both cholestatic and steatotic drugs trigger extensive alterations in the mRNA level of biliary transporters in rat hepatocytes: Application to develop new predictive biomarkers for early drug development. *Toxicol Lett* 2016;263:58-67.
  73. Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* 2013;3:1191-1212.
  74. Ali AH, Carey EJ, Lindor KD. Recent advances in the development of farnesoid X receptor agonists. *Ann Transl Med* 2015;3:5.







## Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

Durante el segundo trimestre del año 2017, hemos realizado un total de dieciocho sesiones científicas, de las cuales cuatro fueron dedicadas a Conferencias y seis mesas redondas por científicos nacionales y extranjeros, tertulias científicas, incorporaciones de Académicos, uno de Número y tres extranjeros; una Sesión Necrológica, una sesión de homenaje y una presentación de un libro. Además tuvieron lugar una serie de actos organizados en colaboración con diversas instituciones nacionales y extranjeras con las que se firmaron Convenios.

### Tomas de Posesión

**El 27 de abril**, la RANF tuvo el honor de celebrar la recepción como Académica Extranjera de la Prof. Liliane Grangeot-Keros, Secretaria adjunta permanente de la Academia Nacional de Farmacia de Francia, y miembro del Centro Nacional OMS de referencia para la Rubéola, en Francia, quien expuso el tema: “*La prevención de infecciones materno-fetales: el papel del farmacéutico*”. Fue presentada por el Académico Secretario de la RANF, Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas. Que expone, sucintamente, la trascendencia de las infecciones en la época actual, con millones de refugiados en Europa, y a nivel mundial el significado del desplazamiento de poblaciones con la necesidad de incluir a los farmacéuticos y estamentos sanitarios en Salud Pública en beneficio de los pacientes, de la sociedad y de toda la humanidad.

Un número de virus (Citomegalovirus, Erythovirus B19, virus de la Rubéola y de la Varicela), de bacterias (*Listeria*, *Treponema pallidum*), de parásitos (*Toxoplasma gondii*) pueden ser transmitidos de la madre al feto. Algunas de estas infecciones solamente son accesibles a través de un tratamiento, pero, la mayoría de ellas pueden prevenirse mediante la vacunación o bien mediante la aplicación de medidas higiénico –dietéticas y sanitarias.

En los países industrializados se han puesto en práctica programas de vacunación para luchar contra la Rubéola y sus indudables consecuencias para el niño. Estas medidas han permitido disminuir de forma significativa el número de rubéolas congénitas que indican a malformaciones. Desgraciadamente, por diversas razones, la cobertura vacunal no es óptima, y todavía es posible observar casos esporádicos de rubéola en la mujer embarazada y algunos casos de rubéola congénita malformativa, especialmente en Francia, mientras que el objetivo era eliminar la rubéola en 2015.

En lo concerniente a la infección por Citomegalovirus, se ha demostrado que los consejos de higiene, rigurosamente aplicados, permiten disminuir de forma muy significativa el riesgo de infección materna. Por otro lado, las medidas higiénico - dietéticas han probado su eficacia, especialmente en la aparición de la toxoplasmosis en la mujer embarazada. El papel del farmacéutico es esencial: debe instaurarse un diálogo con las pacientes embarazadas, e incluso con edad de procrear, y darles oportunos consejos que le sean útiles para prevenir las infecciones transmisibles al niño durante el embarazo.

**El 16 de mayo** la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la Toma de Posesión como Académico Extranjero del eminente Prof. Adolfo García Sastre, En nombre de la Corporación fue presentado por el Presidente de la RANF, el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.

El Profesor Adolfo García Sastre es Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, bajo la dirección del Profesor Enrique Villar, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca y Académico Correspondiente de nuestra Academia. En 1991 comenzó sus estudios de postdoctorado en el Departamento de Microbiología de la Escuela de Medicina Icahn Mount Sinai en New York, donde desarrolló técnicas de ingeniería genética para la construcción de nuevas vacunas contra el virus de la gripe. Durante su período postdoctoral fue galardonado primero con una beca de la NATO y posteriormente con una beca Fulbright.

En la actualidad, el Dr. García-Sastre es Profesor en los Departamentos de Microbiología y Medicina y Director del Instituto de Salud Global y Patógenos Emergentes en la Escuela de Medicina Icahn Mount Sinai en New York. García-Sastre dirige el Centro de Investigación de la Patogénesis de la Gripe, financiado por los Institutos Nacionales de Salud de EEUU. Durante los últimos 25 años ha publicado más de 480 artículos científicos, y su investigación ha contribuido a un

mejor conocimiento de la biología molecular, ciclo de replicación y virulencia tanto de los virus de la gripe como de otros virus importantes en salud humana, tales como los virus Ébola, Dengue, Zika y HIV. Sus estudios han proporcionado las bases para la identificación de nuevos antivirales y vacunas para el tratamiento y la prevención de infecciones víricas.

El Dr. García Sastre expuso su conferencia con el título “*Los virus de la gripe: 1918 -2017*”. Los virus de la gripe desencadenan epidemias anuales y ocasionalmente pandemias caracterizadas por distintos niveles de virulencia y mortalidad en humanos. Su laboratorio ha desarrollado técnicas de genética reversa que permiten la manipulación genética de estos virus y la investigación de sus determinantes de virulencia y de tropismo. El uso de estas técnicas les permitió la resurrección del virus pandémico de 1918, también conocido como virus de la gripe española, a partir de secuencias genéticas obtenidas de tejidos respiratorios de pacientes que murieron de gripe en el 1918. El estudio del virus del 18 nos ha permitido el determinar las razones de su alta virulencia y transmisibilidad. Otros avances científicos han sido posibles gracias a las técnicas de genética reversa como los descubrimientos de las funciones de las distintas proteínas del virus. Concretamente, su laboratorio descubrió la función de la proteína vírica NS1, dedicada a antagonizar la respuesta celular antiviral del interferón. Más recientemente sus trabajos sobre los factores celulares necesarios para la replicación del virus de la gripe tienen un gran potencial de poder dar lugar a nuevos fármacos antivirales. Por último, la genética reversa les ha permitido desarrollar nuevas vacunas contra la gripe con la capacidad de generar una respuesta de protección no solo contra cepas homólogas, sino contra todas las cepas conocidas de este virus desde el 1918 hasta el 2017, al menos en modelos animales. Estudios clínicos en humanos nos dirán en un futuro próximo si tales vacunas realmente producen una protección universal contra la gripe, eliminando la necesidad de vacunar contra la gripe cada año.

**El 1 de junio** la Real Academia Nacional de Farmacia tuvo el honor de celebrar la Sesión Solemne de Toma de Posesión como Académica de Número de la Excm. Sra. Dña. Mercedes Salaices Sánchez. En nombre de la corporación fue contestada por la Académica de Número, la Excm. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal.

Nacida en Madrid el 24 de septiembre de 1952. Licenciada en Biología (1975) y Farmacia (1980) y doctora en Farmacia (1982) por la Universidad Complutense de Madrid. Su actividad profesional se ha desarrollado esencialmente en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), al que se incorporó en 1976 como Profesora Ayudante, para ser posteriormente Profesora Adjunto, Profesora Titular y, desde 1996, Catedrática. Dirige un grupo de investigación encaminado al estudio de mecanismos implicados en las alteraciones vasculares asociadas a patologías cardiovasculares, que pertenece al Instituto de Investigaciones Sanitarias Hospital Universitario La Paz, al Ciber de investigación Cardiovascular y al Instituto Teófilo Hernando. Actualmente su investigación se centra en el estudio de mecanismos inflamatorios y antiinflamatorios responsables de las alteraciones vasculares funcionales y estructurales asociadas a la hipertensión y obesidad. Ha publicado 188 artículos en revistas SCI y ha presentado numerosas comunicaciones, ponencias y conferencias en Congresos y otros foros. Su investigación ha sido financiada por el MEC, MINECO, ISCIII, CM, Fundación Mutua Madrileña, Banco Santander, Fundación Mapfre (21 proyectos competitivos como investigadora principal). Su labor científica ha sido reconocida con diversos Premios y reconocimientos, es “Referee” de varias Revistas Internacionales y evaluadora de organismos nacionales e internacionales de investigación. Ha sido Vicerrectora de la UAM (1995-2000) y Presidenta del Comité Asesor de Ciencias Biomédicas de la CNEAI (2008-2009). Es Tutora del Convenio de la UAM con la Universidad Federal do Espirito Santo (UFES, Brasil) y Profesora Emérita de la UFES (Brasil).

La Dra. Salaices leyó su discurso de ingreso: “*Inflamación y disfunción vascular en hipertensión*”.

La hipertensión arterial afecta al 30% de la población mundial y se considera uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. Desde un punto de vista clínico, la hipertensión sigue siendo un enigma ya que sólo en un 5-10% de los casos se puede identificar la causa. Por otra parte, a pesar del amplio arsenal terapéutico disponible, sigue habiendo un porcentaje alto de pacientes que no responden adecuadamente al mismo. Ello lleva a que la investigación acerca de los mecanismos implicados en esta patología sea de gran importancia. La hipertensión se relaciona con alteraciones tanto a nivel vascular como renal y del sistema nervioso central. Las causas vasculares incluyen disfunción endotelial y remodelado vascular, que tienen valor pronóstico del riesgo cardiovascular. En los últimos años, y al igual que ocurre con otras enfermedades cardiovasculares, se acepta la implicación de mecanismos inflamatorios e inmunológicos en su patogénesis. Entre las evidencias que lo demuestran se incluyen las que indican que en pacientes y modelos de hipertensión están elevados los niveles de marcadores inflamatorios como citoquinas, proteína C reactiva, moléculas de adhesión, especies reactivas de oxígeno, proteínas inflamatorias como COX-2 y se produce infiltración de células inmunes en la pared vascular y otros órganos. Además, dichos marcadores inflamatorios y diferentes componentes del sistema inmune participan en el daño vascular, renal y cardíaco y en la elevación de las cifras de presión arterial. Un mejor conocimiento de estos mecanismos puede permitir desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para evitar el daño cardiovascular asociado a la hipertensión.

**El 8 de junio** tuvo lugar en esta Real Academia Nacional de Farmacia la Toma de Posesión como Académico Extranjero del Prof. Dr. José Juárez Izaguirre, Profesor principal en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, de Lima, Perú, quien disertó sobre: “*Desarrollo de la Farmacia Hospitalaria en Perú*”. Fue presentado por el Académico de Número de la RANF, Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García.

## Sesión Necrológica

**El 25 de mayo** la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la Sesión Necrológica en memoria del Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana. La apertura del acto fue realizada por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF. Intervinieron los Académicos de Número de la RANF: Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, que habló sobre: “*Román de Vicente Jordana: amigo*”; el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, sobre: “*Román de Vicente Jordana: académico*”, el Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón: “*Román de Vicente Jordana: científico*”; y el Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada, Académico de Número de la RANM y Académico Correspondiente de la RANF: “*Román de Vicente Jordana: creyente*”. La hija Dña. Clara de Vicente Albendea del Académico fallecido, expresó unas palabras de agradecimiento a los Académicos que homenajearon recordando a su querido padre, describió las virtudes humanas de trabajo y sociales de su padre, así como las dotes familiares, educativas en la responsabilidad que vivieron en la familia. Clausuró el acto el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez

## Mesas Redondas y Conferencias

**El 4 de abril** tuvo lugar en la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF y de la Fundación Ramón Areces, la Mesa Redonda sobre "INMUNOONCOLOGÍA, BIOMARCADORES AVANCES RECIENTES EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER".

La presentación corrió a cargo del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia y D. Raimundo Pérez-Hernández y Torra, Director de la Fundación Ramón Areces. El coordinador de la sesión fue el Ilmo. Sr. D. Honorio Carlos Bando Casado, Prof. Honorario de la Facultad de Medicina de la UAM y Académico Correspondiente de la RANF. En el acto participaron como ponentes los Doctores: Dr. Alfredo Carrato, Catedrático y Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Ramón y Cajal; la Dra. Pilar Garrido, Jefa de Sección de Oncología Médica y Presidenta del Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud; y la Dra. Pilar García-Alfonso, Jefa de Sección Oncológica del Hospital Gregorio Marañón. Clausuró el acto el Dr. Mariano Esteban Rodríguez.

**El 6 de abril** la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la Mesa Redonda sobre: “RESIDUOS, CONTAMINACIÓN Y SALUD AMBIENTAL (2ª parte)”.

Presidió el acto el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Estuvo coordinado por el Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez, Académico de Número de la RANF. Actuaron como ponentes: el Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada, Académico de Número de la R.A.N de Medicina y Correspondiente de la RANF, que habló sobre “*La problemática actual del agua en el mundo*”; y el Ilmo. Sr. D. Juan Miguel Rodríguez Gómez, Catedrático del Área de Nutrición y Bromatología de la UCM y Miembro de la Junta Directiva del Instituto Madrileño de Estudios Avanzados.

El Dr. Rodríguez Gómez es Doctor en Veterinaria (UCM, 1991). Catedrático de Nutrición y Bromatología, Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Director del grupo de investigación "Microbiota Perinatal" (UCM). Actualmente coordina (IP) varios proyectos de investigación en ese ámbito, incluyendo un proyecto europeo sobre la salud de los niños prematuros. Ha participado en 35 proyectos públicos de investigación, siendo el Investigador principal en 23 de ellos, incluyendo tres proyectos europeos. Investigador principal en 25 contratos de investigación con empresas. Director de la empresa de base tecnológica Probisearch entre 2011 y 2016. Co-Autor de 140 artículos en revistas científicas internacionales (103 de ellos en el primer cuartil de su categoría). (Co-)inventor de 9 patentes internacionales (PCT), Miembro de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP). Miembro del patronato del IMDEA (Instituto Madrileño de Estudios Avanzados). Colaborador de la recientemente creada Agencia Española de Investigación (área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos). El Dr. Rodríguez disertó sobre “*Contaminantes ambientales con actividad endocrina*”.

**El 20 de abril** la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la Mesa Redonda sobre: "EL BALNEARIO DE PARACUELLOS DE JILOCA (ZARAGOZA)"

Participaron como ponentes: La Dra. María Roser Botey Fullat, que expuso el “*Estudio de la Climatología del Balneario*”. En su exposición presentó el estudio climático y bioclimático del Balneario de Paracuellos de Jiloca, realizado a partir de datos de precipitación, temperatura, humedad relativa y viento, de estaciones de AEMET ubicadas cerca del Balneario. Se presentaron los valores medios mensuales para cada uno de los parámetros climáticos relevantes, así como los valores extremos, la frecuencia de superación de determinados umbrales, las tendencias a largo plazo y los valores de determinados índices climáticos.

Los Dres. D. Daniel P. de la Cruz Sánchez Mata y D. Miguel Ladero Álvarez que presentaron el “*Estudio sobre la Vegetación del Entorno de las Aguas del Balneario*”. El Balneario de Paracuellos de Jiloca (Zaragoza) se encuentra en el Municipio del mismo nombre, situado a orillas del río Jiloca, afluente del río Jalón que lo es, a su vez, del río Ebro, en la comarca aragonesa de la Comunidad de Calatayud. El territorio de su término municipal está caracterizado por un termitipo mesomediterráneo y ombrotipo seco inferior. Los suelos se originaron, básicamente, a partir de rocas sedimentarias o evaporíticas predominando los suelos margosos, yesíferos o margoso-yesíferos en mosaico con suelos subsalinos o salinos en las depresiones o valles mientras que los suelos de pseudogley o gley cubren los valles y cauces fluviales. La vegetación del entorno del balneario está fuertemente antropizada. Comunidades diversas de tomillares y matorrales

seriales, de alto valor ecológico, se desarrollan sobre suelos margosos y margoso-yesíferos dominando el paisaje de las colinas y lomas acarcavadas por la erosión donde la sabina albar (*Juniperus thurifera*) y la sabina mora (*Juniperus phoenicea*) formaban antaño bosquetes abiertos de carácter relictico; vegetación preforestal y forestal de sotos y riberas (olmedas, choperas, saucedas) contrastan en frescura y verdor hacia los valles y cursos fluviales, en muchas ocasiones sustituida por cultivos hortícolas y de diversos árboles frutales. En los suelos de carácter yesífero se ubican algunos hábitats de interés con táxones endémicos de relevante interés biogeográfico o corológico.

La Dra. Esperanza Torija Isasa, que expuso el “*Estudio físico-químico de las aguas del Balneario*”. Describió que Las aguas minero-medicinales de Paracuellos de Jiloca se conocen desde tiempos muy antiguos y se han utilizado a lo largo de los siglos. Estas aguas fueron declaradas de utilidad pública el 31 de marzo de 1869. En relación a los caracteres organolépticos, destaca su olor a huevos podridos, debido a su elevado contenido de ácido sulfhídrico. Se trata de aguas hipotermales, que surgen a una T de 17°C; su pH es de 7,2. Se caracterizan por un elevado residuo seco, muy próximo a 15000 mg/L (a 180°C) y una conductividad también muy elevada (12800 µS/cm), lo que da idea de su fuerte mineralización. Entre sus características más destacadas se encuentran los elevados contenidos de cloruros (más de 4000 mg/L), sulfatos (cerca de 4000 mg/L), calcio (del orden de 900 mg/L) y magnesio (del orden de 700 mg/L), lo que se relaciona con una dureza de más de 5000 mg/L de CaCO<sub>3</sub>. El contenido de sodio fue superior a los 3700 mg/L. Por los análisis realizados se pueden considerar estas aguas como hipotermales, de mineralización fuerte, cloruradas, sulfatadas, fluoradas, sulfuradas, sódicas, cálcicas, magnésicas y muy duras.

Y las Dras. Dña. Josefina San Martín Bacaicoa y Dña. Inés Martínez Galán, nos presentaron el “*Estudio de la acción terapéutica de las aguas del Balneario*”, Señalaron la situación y antecedentes de la actividad del Balneario. Las características de las aguas, las vías y técnicas de administración, indicaciones y contraindicaciones de las mismas, así como la patología más frecuente que presentan los pacientes y usuarios que acuden al Balneario."

**El 11 de mayo** la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la Mesa Redonda titulada: “*La Ciencia de las adicciones. Aspectos clínicos y sociales: Maltrato infantil y trastornos por uso de alcohol. Un estudio de investigación traslacional*”. El acto fue presidido por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia; y coordinado por el Excmo. Sr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, Académico de Número de la RANF. Actuaron como ponentes los Dres. D. Gabriel Rubio Valladolid, Jefe de Sección del Servicio de Psiquiatría, Hospital Universitario 12 de Octubre y Profesor Titular del Departamento de Psiquiatría en la Universidad Complutense de Madrid: “*¿Qué tipo de maltrato infanto-juvenil puede predecir la aparición de trastornos por uso de alcohol? Un estudio prospectivo durante 4 años de seguimiento*”; D. Jorge Manzanares Robles, Catedrático de Farmacología, Universidad Miguel Hernández, Instituto de Neurociencias-UMH-CSIC: “*Efecto del abandono maternal como método de maltrato en roedores y vulnerabilidad por la aparición de trastornos de la conducta y consumo de alcohol*”.

En la dependencia alcohólica influyen factores biológicos-psicológicos y ambientales. Son clásicos los estudios que afirman que el alcoholismo se transmite familiarmente, y también los que han estudiado el papel de las situaciones traumáticas infantiles en la vulnerabilidad para el alcoholismo. Dentro las experiencias traumáticas, las que más atención han recibido han sido las relacionadas con el maltrato físico y con el abuso sexual. Sin embargo, en la última década se ha puesto de manifiesto que el abuso emocional y la negligencia emocional también pueden tener un papel decisivo tanto para el alcoholismo como para otros trastornos psiquiátricos. Nuestro grupo ha puesto de manifiesto el papel de diferentes tipos de maltrato sufrido durante la infancia y adolescencia en la presencia del poli-abuso de sustancias, tanto en un estudio transversal como en otro en el que se han obtenido datos sobre trastornos por uso y abuso de sustancias tras 4 años de seguimiento. Nuestros resultados coinciden con señalar que el abuso de múltiples sustancias se asocia con la gravedad del maltrato, pero que un tipo de maltrato, "aparentemente menos grave", como es el de la negligencia emocional, se asocia tanto a la presencia de madre/padre alcohólico como al desarrollo y mantenimiento de dependencia del alcohol en ambos sexos. Estos resultados indican que las experiencias de negligencia emocional referidas por los adolescentes pueden ser un factor de riesgo para el abuso de drogas, por lo que familias, profesores y pediatras deberían tener en consideración estos datos para detectar estas situaciones y así prevenir el desarrollo de trastornos por uso de alcohol y otros trastornos psiquiátricos. Por otro lado, nuestro grupo también ha desarrollado un modelo animal de maltrato infantil por separación maternal en roedores. Este estudio ha demostrado que en este modelo se produce en las crías adolescentes alteraciones conductuales importantes (aumento del grado de ansiedad y depresión, déficit pre-atencional y en procesos de consolidación de memoria). Estas alteraciones se relacionan a su vez con un mayor alto de vulnerabilidad por el consumo de alcohol y de mayor sensibilidad a estímulos estresantes en la edad adulta. Es interesante destacar que todas las modificaciones conductuales se relacionan con cambios en la plasticidad cerebral, alteraciones en la expresión de genes y en proteínas relevantes con los elementos constitutivos neuronales. El estudio en su conjunto demuestra la importancia de la simbiosis de grupos de investigación clínica y experimental para comprender mejor los problemas derivados de los trastornos por uso de sustancias como el alcohol y el grado de relevancia de las características ambientales sobre la funcionalidad de marcadores cerebrales y posiblemente en el establecimiento de estrategias de prevención en el tratamiento de este tipo de pacientes.

**El 18 de mayo** la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración de la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF organizaron la “*Jornada Científica sobre recientes avances en la hepatotoxicidad de fármacos*”, cuya

introducción corrió a cargo de la Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Participaron como ponentes: La Dra. María José Gómez-Lechón Moliner, Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia con su intervención sobre "*Modelos celulares hepáticos avanzados para el estudio preclínico del metabolismo y hepatotoxicidad de Fármacos*"; La Dra. María Teresa Donato Martín, Investigadora de la Unidad de Hepatología Experimental del Hospital Universitario La Fe, y Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Valencia, que habló sobre "*Hepatotoxicidad idiosincrásica por fármacos: promesas y limitaciones de las estrategias in vitro*"; y el Dr. Ramiro Jover Atienza, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, que nos habló sobre "*Esteatosis y colestasis inducida por medicamentos: mecanismos y biomarcadores*". Clausuró el acto el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.

**El 15 de junio** la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la Mesa Redonda sobre: "*Posible papel del microbioma en el eje cerebro-intestino*", cuya Presentación y Coordinación corrió a cargo de la Excma. Sra. Dña. Ana María Pascual-Leone Pascual, Académica de Número de la RANF e Investigadora del CSIC.

Como ponentes participaron los Excmos. Sres. D. Rafael Sentandreu Ramón, Académico de Número de la RANF y Catedrático de Microbiología, actualmente Prof. Emérito de la Universidad de Valencia: "*El hombre y los microorganismos: el eje cerebro/intestino*"; y D. Sebastián Cerdán García-Esteller, Académico de Número de la RANF y Profesor de Investigación del CSIC: "*Regulación directa de la actividad hipotalámica por la microbiota intestinal detectada mediante Imagen y Espectroscopia de Resonancia Magnética*"

En la presentación de la mesa, la Dra. Pascual-Leone expone, sucintamente, la importancia de la homeostasis energética para la salud de los organismos, y presenta a los ponentes. En la primera ponencia, "El hombre y los microorganismos: el eje cerebro /intestino", el Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu explica, desde un punto de vista microbiológico y amplio, la importancia y el porqué de la microbioma y su posible implicación en patologías.

Posteriormente, el Excmo. Sr. D. Sebastián Cerdán habla de trabajo propio, recientemente publicado en Nature Comm., "Regulación directa de la actividad hipotalámica por la microbiota intestinal detectada mediante Imagen y Espectroscopia de Resonancia Magnética", técnicas en las cuales ha venido trabajando largamente durante muchos años.

**El 27 de abril** la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la Conferencia: "*Nuevos genes implicados en el origen de las arritmias cardíacas hereditarias*" a cargo de la Ilma. Sra. Dña. Eva Delpón Mosquera, Académica Correspondiente de la RANF quien fue presentada por Presidente de la RANF, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.

Los síndromes arritmogénicos hereditarios (SAH) que aparecen en sujetos con corazones estructuralmente normales son la principal causa de muerte súbita cardíaca. Todavía hoy se desconoce la causa genética responsable de la aparición de los SAH en muchas familias en las que no se identifican mutaciones en los genes asociados hasta la fecha a dichos SAH. Nuestro grupo coordina el consorcio (ITACA) dirigido a la investigación traslacional de los SAH con el fin de genotipar a sujetos diagnosticados clínica pero no genéticamente en los principales hospitales públicos de la Comunidad de Madrid. El objetivo principal del consorcio es el estudio funcional de las mutaciones identificadas para, en último término, conocer los mecanismos moleculares y celulares que controlan la actividad eléctrica cardíaca regulando la expresión, localización y actividad de los canales iónicos en los miocitos cardíacos. En la presentación mostraremos dos ejemplos para ilustrar cómo esta estrategia experimental nos ha permitido identificar el papel que juega el factor de transcripción Tbx20 y la proteína de anclaje SAP97 en el control de la duración de los potenciales de acción cardíacos.

**El 4 de mayo** se celebró la Conferencia "*La ingeniería biomédica y su influencia en el desarrollo del Homo sapiens*", a cargo del Dr. Carlos M. Atienza Vicente, Doctor Ingeniero Industrial, Director de Innovación en Tecnología Sanitaria. Instituto de Biomecánica. Universidad Politécnica de Valencia, quien fue presentado por el Académico de Número de la RANF el Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón.

**El 25 de mayo** a las 17,30 horas la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF organizó la Conferencia "*ERC. Ten years after*" a cargo del Dr. José Labastida, Director del Departamento Científico del European Research Council, quien fue presentado por la Académica de Número, la Excma. Sra. Dña. María Vallet Regí.

"El European Research Council: Diez años después", incluimos el resumen en inglés. The European Research Council (ERC) was founded in 2007 as an organization to fund frontier research in all areas of knowledge through pan-European competitions. Ten years later ERC has become a prominent actor in the European research landscape after funding more than 7000 projects carrying out top-quality research. The conference presents the main achievements met during these ten years, highlighting the key elements that are behind ERC's success. In addition, the overall performance of researchers based in Spanish research institutions will also be present.

**El 8 de junio** se celebró la Conferencia titulada "*La nueva tecnología de secuenciación masiva (NGS) en tripanosomátidos*" a cargo del Ilmo. Sr. D. Vicente Larraga, Académico Correspondiente de la RANF. Fue presentado por el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Antonio Ramón Martínez Fernández.

El Dr. Larraga explicó la nueva técnica de secuenciación masiva (NGS) en tripanosomátidos. El ejemplo de Leishmania.

Muy bien estudiado por el Dr. Vicente Larraga, del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid. Las nuevas técnicas de secuenciación masiva (NGS) están produciendo una mejora muy notable en la búsqueda de moléculas con posible valor preventivo de la infección en tripanosomátidos en general y en *Leishmania* en particular. La mejora técnica permite obtener secuencias de genomas completos en pocas horas que pueden ser interpretados en pocas semanas, gracias a los nuevos programas bioinformáticos. No obstante, no se trata solamente de una mejora en la rapidez en la obtención de secuencias de moléculas específicas del metabolismo del parásito, sino también de la especificidad de los análisis. Así, la secuenciación de ARN permite, utilizando cebadores específicos del mini-exón, detectar, gracias a la especificidad del trans-splicing y a la presencia de la secuencia del mini exón en todas ellas, aquellas moléculas que pertenecen al protozoo sobre otro tipo de moléculas, presentes como contaminantes, procedentes del huésped mamífero. Esta especificidad en la reacción de RNAseq está permitiendo detectar moléculas de *Leishmania* en muestras muy pequeñas obtenidas de preparaciones de pacientes, tanto humanos como animales, así como procedentes del vector flebótomo, hasta ahora imposibles de estudiar desde el punto de vista molecular. Esta tecnología permite también analizar cantidades mínimas de parásito en una preparación procedente de huéspedes con características clínico/biológicas específicas (casi un single cell detection). Ya sea con un tipo determinado de manifestación clínica o con una mayor sensibilidad o resistencia a una cepa del parásito. Este tipo de estudio está produciendo un avance notable en el conocimiento de los posibles mecanismos de la infección y permite la detección más rápida de posibles candidatos, tanto a moléculas protectoras vacunales como a dianas terapéuticas.

### **Tertulias científicas**

**El 6 de abril** la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF la TERTULIA CIENTÍFICA titulada: “*Memoria histórica de la Industria Farmacéutica en España (1936-2008)*”. Presentada por el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Académico de Número de la RANF, que contó con la ponencia del Ilmo. Sr. D. Federico López Mateos, Catedrático jubilado, de Química Industrial, Economía y Proyectos, de la Facultad de Químicas de la UCM, y Académico Correspondiente de la RANF.

### **Sesión Homenaje**

**El 8 de mayo** la Real Academia Nacional de Farmacia albergó la celebración del “*Encuentro con Carlos González Bosch: entorno a Cultura, Humanidades y Farmacia*”. El acto fue presidido por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF; contó con las intervenciones de: El Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, Académico de Número de la RANF y de la RAH, el Excmo. Sr. D. Raúl Guerra Garrido, Escritor y Medalla Carracido de Oro de la RANF y la Ilma. Sra. Dña. Inma Shara, Directora de Orquesta.

### **Presentación de Libro**

**El 14 de junio** la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF, celebraron la Presentación del Libro “*Mediterranean Wild Edible Plants. Ethnobotany and Food Composition Tables*”. El acto fue presidido por el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, Académico Secretario de la RANF. La Introducción fue llevada a cabo por la Ilma. Sra. Dña. Esperanza Torija Isasa, Académica Correspondiente de la RANF. Los Editores que participaron en la presentación fueron: Prof. Dra. María de Cortes Sánchez Mata, Prof. Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología II, Facultad de Farmacia de la UCM:

“*Conociendo las plantas silvestres comestibles: una alternativa saludable para nuestra alimentación*” y el Dr. Javier Tardío Pato, Instituto madrileño de investigación y desarrollo rural, agrario y alimentario, IMIDRA, con el título: “*Plantas silvestres comestibles de uso tradicional*”

### **Otros actos en la RANF**

**El día 25 de abril** la Real Academia Nacional de Farmacia y la Universidad San Pablo CEU celebraron el “DÍA INTERNACIONAL DE LA MALARIA”.

La presentación corrió a cargo del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente la RANF y de la Dra. Beatriz de Pascual-Teresa Fernández, Académica Correspondiente de la RANF, y Decana de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU San Pablo.

Participaron como ponentes los Dres.: D. Antonio Martínez Fernández, Académico de Número la RANF y Catedrático de Parasitología de la UCM: “*Paludismo, ¿Una amenaza menguante?*”; Dña. Laura Sanz Alonso, Biology Manager, Malaria DPU Biology Manager en el Instituto Glaxo- Smith- Kline DDW, ubicado en Tres Cantos, Madrid, con el título: “*Descubrimientos de nuevos fármacos antimaláricos: Nuevas soluciones para una vieja enfermedad*”; y el Dr. Ruprecht Schmidt-Ott, Director Scientific Affairs and Public Health, Europe, de Glaxo- Smith- Kline Vaccines Wavre, Belgium “RTS,S/AS01, con el título: “*The journey towards a malaria vaccine*”.

**El 18 de mayo** la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con los Laboratorios Merck Sharp & Dohme celebraron la Jornada sobre “*Vacunas del Adulto*”. Actuó como moderador el Dr. Honorio Bando Casado, Profesor Honorario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. La presentación fue realizada por el Dr. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la



Real Academia Nacional de Farmacia y la Dra. Regina Revilla Pedreira, Executive Director Policy & Comm. MSD.

En la Jornada actuaron como ponentes, la Dra. Esther Redondo Margüello, Jefa División Vacunación Internacional del Centro de Salud Internacional de Madrid Salud, y Miembro del Comité Asesor de Vacunas de la Comunidad de Madrid, que disertó sobre “*La vacunación del adulto: la gran desconocida*”; La Dra. María del Carmen Magro Horcajada, Farmacéutica Comunitaria y Coordinadora del Grupo de Inmunología de la Sociedad Española de Farmacia Familiar y Comunitaria – SEFAC, que disertó sobre “*El papel del farmacéutico comunitario. Desde la recepción a la dispensación de las vacunas en el adulto*”. Tras el debate, el acto fue clausurado por el Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez.

### Otros Actos

**El 30 de mayo** se celebró en la Fundación Ramón Areces, la Mesa Redonda titulada: “*Investigación e innovación en Cardiología. Ciencias de la Vida y de la Materia*”. El Coordinador del Acto fue el Dr. Honorio Carlos Bando, Académico Correspondiente de la RANF y Profesor Honorario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. La inauguración de la Mesa corrió a cargo del Dr. Raimundo Pérez-Hernández y Torra, Director de la Fundación Ramón Areces y del Dr. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

D. Honorio actuó de moderador y como ponente, junto a los Dres. Francisco Fernández Avilés, Jefe de servicio de Cardiología del Hospital Universitario Gregorio Marañón de Madrid, Julián Pérez-Villacastín, Director del Instituto Cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y D. Juan Tamargo Menéndez, Catedrático de Farmacología, de la Universidad Complutense de Madrid. Clausuró el acto el Presidente de la RANF D. Mariano Esteban Rodríguez.

**El 21 de junio**, representantes de las Reales Academias de Medicina y Farmacia se reunieron en la Cámara Baja con Parlamentarios de Sanidad del Congreso y del Senado, para exponerles diferentes iniciativas, propuestas y reivindicaciones en materia de salud e intentar dar respuesta a sus principales preocupaciones sobre el tema.

La RANF ha mostrado a los políticos su postura ante temas de candente actualidad, como la Homeopatía, o las Vacunas, de las que abogaron por una mayor información a la población española, europea, y para toda la humanidad. Con el objetivo de una mayor y mejor elaboración de los calendarios vacunales, y una mayor inversión en prevención e investigación en beneficio de la Salud Pública. Igualmente, han sugerido diversas propuestas como la educación de la población en temas sanitarios o la gran dificultad en la penosa realidad de la Academia por mantener los objetivos marcados tras los recortes, que a pesar de todo se llevan a cabo por la dedicación y esfuerzo de todos los Académicos y de los conferenciantes invitados que comprenden la situación de crisis económica actual.

### Fallecimientos

En el capítulo de obituarios, hemos de lamentar el fallecimiento del Académico Correspondiente, el Ilmo. Sr. D. Enrique Villar Ledesma, el pasado 2 de abril. Brillante ex alumno, discípulo y colaborador del Prof. José Antonio Cabezas, y su sucesor desde 1999 en la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca. A causa de un accidente al participar con otros colegas de la misma Universidad, en una actividad de senderismo de montaña en la Sierra de Ayllón, durante cuya travesía le sobrevino un infarto de miocardio de fatal prognosis, de cuyo estado y situación sus acompañantes médicos no pudieron restituir su continuidad sistémica y salvarle. Nuestra profunda condolencia a su esposa, Inspectora de Farmacia, a sus dos hijas, Licenciadas en Medicina, todas ellas brillantes profesionales, así como al resto de su distinguida familia.

### Honores que han recibido nuestros Académicos

La Excma. Sra. Dña. María Vallet Regí, Catedrática de Química Inorgánica y líder del Grupo de Investigación de Biomateriales Inteligentes (GIBI-UCM), ha sido galardonada, en su segunda edición, con el 'Premio Julio Peláez a Pioneras de las Ciencias Físicas, Químicas y Matemáticas', que concede anualmente la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno y está dotado con 12.000 euros.

**El pasado día 15 de mayo**, se celebró en Barcelona, en la sede de la RAFC, una sesión necrológica en recuerdo del excelente Profesor de Farmacia y Tecnología Farmacéutica Dr. José Cemeli Pons (1931-2017). La Real Academia de Farmacia estuvo representada por nuestro compañero Dr. Benito del Castillo García.

**El 22 de junio** nuestro Académico de Número D. Benito del Castillo García, ha sido elegido Vice-Presidente de esta Real institución que se honra y muestra su satisfacción, por contar entre los miembros de su Junta de Gobierno, tan destacado y eminente docente y científico, con renombre internacional, y responsable hasta ahora de las relaciones con Iberoamérica e internacionales con destacado éxito por sus contactos y experiencia internacional.

**El 30 de junio** el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez ha recibido un emotivo homenaje, con motivo de su jubilación.

### Informe sobre homeopatía de la RANF

En relación con los productos homeopáticos, la Real Academia Nacional de Farmacia ha elaborado un documento sobre la Homeopatía, que ha colgado en su página WEB y que será distribuido próximamente a las oportunas instituciones nacionales e internacionales.

En ese contexto recordamos que es función de nuestra institución académica plantear, discutir y analizar aquellos temas

que son importantes para la sociedad civil y que contribuyen al conocimiento del medicamento, a la salud y al bienestar de los ciudadanos. Para la Real Academia Nacional de Farmacia, la salud pública en general y los medicamentos en particular, son objetivos prioritarios en su actividad científica y de difusión del conocimiento.

Mejorar la calidad de la terapéutica farmacológica es un objetivo común para las autoridades sanitarias, profesionales, pacientes y para toda la sociedad. Las consecuencias de una baja calidad en la terapéutica tiene un impacto clínico negativo y una importante repercusión social y económica.

La homeopatía está sometida desde hace décadas a discusión en diferentes foros, aunque solo en muy contadas ocasiones se analiza desde el punto de vista científico e incidencia con la situación actual del conocimiento. Los medicamentos homeopáticos son una realidad también en los países desarrollados y deberían ser analizadas bajo los mismos criterios que se aplican a otros recursos terapéuticos, los medicamentos.

La Real Academia Nacional de Farmacia se ha visto en la necesidad de elaborar un informe en el que se analiza, desde un punto de vista científico, las características de los medicamentos homeopáticos, especialmente los aspectos relacionados con su eficacia y seguridad. Este informe expresa la posición de los académicos de número de la Real Academia Nacional de Farmacia sobre los medicamentos homeopáticos y consta de una introducción, 40 consideraciones y 12 conclusiones.

En el texto se incluyen informes de diferentes organismos públicos (OMS, NHMCR, NICE, etc.), agencias reguladoras (FDA, EMA, etc.), sociedades científicas (RCGP, RPS, etc.), etc., que han realizado análisis crítico sobre los medicamentos homeopáticos, destacando la falta de evidencia en relación a su eficacia.

La *Royal Pharmaceutical Society* del Reino Unido ha hecho público en 2017 un documento en el que se declara que los tratamientos homeopáticos no tienen una base científica y recomienda que los farmacéuticos deben advertir a los pacientes que consumen medicamentos homeopáticos, de los riesgos de abandonar los tratamientos farmacológicos de prescripción médica.

El contenido de este documento es independiente, está basado en criterios científicos y adaptado a la situación actual del conocimiento. Las opiniones incorporadas al texto son expresadas con la mayor objetividad posible.

Bartolomé Ribas Ozonas  
Académico Secretario RANF